Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Untersuchungen zur Differenzierung von Vibrio fetus und Vibrio bubulus mit der Bakterienagglutination und der indirekten Hämagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christoph Bayer
aus Schleswig

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0036

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Untersuchungen zur Differenzierung von Vibrio fetus und Vibrio bubulus mit der Bakterienagglutination und der indirekten Hämagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christoph Bayer
aus Schleswig

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. W. Graumann

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. R.-E. Bader
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.J. Knüttgen

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A Einleitung
1. Die Bedeutung von Vibrio fetus und verwandten Vibrionenarten in der Human- und Veterinärmedizin 1
2. Die Differenzierung von Vibrio fetus und Vibrio bubulus
a) Kulturell-biochemische Methoden 4
b) Serologische Methoden 11
3. Bisherige Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination an Vibrio fetus 17

B Eigene Untersuchungen
1. Material und Methoden 21
2. Ergebnisse
a) Vorversuche zur indirekten Hämagglutination mit Vibrio fetus 26
b) Hauptversuche zur serologischen Differenzierung von Vibrio fetus- und Vibrio bubulus-Stämmen 31

C Diskussion 41

Zusammenfassung 48

Literaturverzeichnis 50

A EINLEITUNG

1. Die Bedeutung von Vibrio fetus und verwandten Vibrionenarten in der Human- und Veterinärmedizin

Vibrio fetus, der Hauptvertreter aus der Gruppe der parasitären, anaeroben oder mikroaerophilen Vibrionen (BERGEY 1957), ist durch SMITH (1918) sowie SMITH und TAYLOR (1919) aus Abortmaterial von Rindern isoliert, genau beschrieben und von den Spirillen abgegrenzt worden. Seit dieser Zeit gilt Vibrio fetus als eine der Hauptursachen für Aborte bei Rind und Schaf. Seine volle veterinärmedizinische Bedeutung wurde jedoch erst erkannt, als PLASTRIDGE et al. (1947) nachwiesen, daß Vibrio fetus auch für langdauernde Sterilität des Rindes ohne Aborte verantwortlich sei, und zwar durch die Erzeugung einer Endometritis (DOZSA et al. 1962). Der große wirtschaftliche Schaden durch die "Vibriosis genitalis" soll den durch die Brucellose verursachten Schaden in manchen Ländern sogar noch übertreffen (KAMEL 1960).

Verwandte Vibrionenarten sind auch bei anderen Tieren nachgewiesen worden: z.B. bei Pferden (WINKENWERDER und BÖTTCHER 1965), bei Schweinen (Vibrio coli DOYLE 1944), bei Katzen (VALLÉE et al. 1961), bei Hühnern (PECKHAM 1958). Bei Rindern findet sich außer Vibrio fetus noch Vibrio bubulus FLORENT 1953 im Genitaltrakt sowie Vibrio jejuni JONES, ORCUTT and LITTLE 1931 im Intestinaltrakt. Die Pathogenität aller dieser Arten ist jedoch gering oder sehr umstritten, wenn man von der Vibrionenhepatitis bei Hühnern absieht (WINKENWERDER und MACIAK 1964).

Über die Erkrankung eines Menschen durch Vibrio fetus ist zuerst durch VINZENT et al. (1947) berichtet worden. Seither sind in der Literatur etwa 50 Fälle eingehend dargestellt worden (s. die Übersicht bei BADER et al. 1966, weitere Fälle bei WHEELER und BORCHERS 1961, MANDEL und ELLISON 1963, BURGERT und HAGSTROM 1964, KILO et al. 1965, WHITE 1967, DARRELL et al. 1967, und BOKKENHEUSER 1968). Nach WINKENWERDER (1966) soll die Zahl der durch positive Kulturversuche gesicherten Fälle sogar über 75 betragen. Die wirkliche Zahl der Erkrankungen dürfte indes wegen der Schwierigkeiten bei der Isolierung von Vibrio fetus sowie wegen der Vielfalt und Unbekanntheit der Krankheitsbilder noch wesentlich höher liegen. Dennoch ist die menschliche Vibriosis insgesamt als eine Seltenheit anzusehen, für ihr jeweiliges Zustandekommen sind besonders ungünstige Umstände im Sinne einer Infektbahnung anzunehmen (BADER et al. 1966).

Neben Vibrio fetus finden sich auch beim Menschen noch verwandte Vibrionenarten, deren Pathogenität nicht sicher ist: in der Mundhöhle (Vibrio sputorum PRÉVOT 1940, über die Ähnlichkeit zu Vibrio bubulus vgl. LOESCHE et al. 1965) und im Vaginalsekret (CURTISS 1913, MOORE 1954). Aber auch die bei Erkrankungen isolierten Stämme scheinen keine einheitliche Gruppe zu bilden; so trennte KING (1957 und 1962) von Vibrio fetus im engeren Sinne einige Stämme als "related vibrios" ab, sie vermutete Beziehungen zu Vibrio jejuni, Vibrio coli und zu Hühnervibrionen.

Die menschliche "Vibriosis" ist klinisch kein einheitliches Krankheitsbild: sie umfaßt vor allem

septische Verläufe, Meningitiden (besonders bei Säuglingen), fieberhafte Aborte, Gastroenteritiden (durch "related vibrios") und Arthritiden (vgl. die Übersichten bei KILO et al. 1965, BADER et al. 1966, WINKENWERDER 1966). Genau so unterschiedlich sind auch die Vermutungen über die jeweilige epidemiologische Situation. In Betracht gezogen werden der Kontakt zu Tieren, vor allem zu Rindern (VINZENT et al. 1947, SPINK 1957), bei den "related vibrios" auch zu Hühnern (WHEELER und BORCHERS 1961), daneben die Möglichkeit einer Venerealinfektion (EDEN 1962, HOOD und TODD 1960) oder auch eines symptomlosen Trägerzustandes mit Aktivierung unter Belastung (KING 1957).

Eine Voraussetzung zur Klärung dieser schwierigen Zusammenhänge ist es, eine weitergehende Differenzierung von Vibrionen menschlicher und tierischer Herkunft mit serologischen oder kulturell-biochemischen Methoden durchführen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die serologische Methode der indirekten Hämagglutination zur Typendifferenzierung von Vibrio fetus-Stämmen und zu deren Abgrenzung gegenüber Stämmen der differentialdiagnostisch wichtigen Art Vibrio bubulus anzuwenden und die Ergebnisse mit denen der klassischen Bakterienagglutination zu vergleichen. Vor der Darstellung der eigenen Ergebnisse soll jedoch zunächst ein Überblick über die Literatur zur Differenzierung dieser beiden Arten sowie über die bisher bekannten Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination an Vibrio fetus gegeben werden.

2. Die Differenzierung von Vibrio fetus und Vibrio bubulus

a) Kulturell-biochemische Methoden

FLORENT isolierte 1953 aus dem Genitaltrakt von Rindern eine bis dahin unbekannte Vibrionenart, wies im Inokulationsversuch an der Färse ihre Apathogenität nach und nannte sie Vibrio bubulus. Er gab als Unterscheidung zu Vibrio fetus eine starke H_2S-Bildung dieser Stämme an, außerdem, daß Vibrio bubulus strikt anaerob, Vibrio fetus dagegen mikroaerophil sei. BRYNER und FRANK fügten 1955 als weiteres Kennzeichen hinzu, daß Vibrio fetus, nicht aber Vibrio bubulus Katalase bildet, und 1956 zeigten KUZDAS und MORSE, daß Vibrio fetus im Gegensatz zu Vibrio bubulus nicht in einem Nährboden mit 3,5% NaCl-Zusatz wachsen kann.

Insgesamt wird heute die Unterscheidung zwischen Vibrio fetus und Vibrio bubulus allein auf Grund biochemischer Merkmale durchaus für zuverlässig gehalten, wobei der Katalasetest die wichtigste Rolle spielt. Die unterschiedliche Pathogenität von katalasepositiven und -negativen Vibrionen ist wiederholt bestätigt worden (s. die Übersicht in Vet. Rec. 1958, anonym), allerdings muß man nach FLORENT (1959) beim Rind mit dem seltenen Auftreten katalasepositiver apathogener Vibrionen rechnen, die aber aerob wachsen und sich auch serologisch sicher von Vibrio fetus-Stämmen trennen lassen.

Der Unterschied zwischen Vibrio fetus und Vibrio bubulus wurde auch in Untersuchungen von SEBALD und VÉRON (1963) über die Basenzusammensetzung der DNS bei Vibrionen deutlich: der sogenannte "CG-Quotient"

(Prozentsatz des Guanins und Cytosins zusammen an dem Gesamtbasengehalt der DNS) betrug bei Vibrio fetus-Stämmen im Durchschnitt 34%, bei Vibrio bubulus-Stämmen dagegen 30%, was auf eine genetische Differenz zwischen diesen beiden Arten hinweist. Jedoch war der Unterschied zu anderen Vibrionenarten (Vibrio comma, Vibrio metchnikovi u.a.) noch deutlicher, da der "CG-Quotient" bei diesen Arten zwischen 44 und 50% lag. Daher schlugen SEBALD und VÉRON vor, Vibrio fetus und Vibrio bubulus als "Genus Campylobacter" zusammenzufassen und vom Genus Vibrio MÜLLER (1773) abzutrennen (Diskussion dieser Vorschläge bei DE LEY 1964).

Auch unter den Vibrio fetus-Stämmen wurde eine Typenunterscheidung mittels kulturell-biochemischer Kriterien versucht. AKKERMANS, TERPSTRA und van WAVEREN (1956) unterschieden unter den katalasepositiven Vibrionen zwei Gruppen, mit I und III bezeichnet; die Gruppe II entsprach Vibrio bubulus. Die Gruppe I wurde als sehr pathogen und bei Rindern sterilitätserzeugend charakterisiert, sie zeigte kein Wachstum unter NO_2-Druck und keinerlei H_2S-Bildung. Die Gruppe III sollte bei Kühen nur für sporadische Aborte ohne langdauernde Sterilität verantwortlich sein, dagegen bei Schafaborten häufiger gefunden werden, sie zeigte Wachstum auch unter NO_2-Druck und auf bestimmten Nährböden auch eine geringe H_2S-Bildung.

FLORENT (1959) gelang es, Vibrio fetus-Stämme auch aus dem Darm von Rindern zu züchten. Er wies nach, daß diese Stämme den aus sporadischen Rinderaborten gezüchteten gleichen und der Gruppe III nach TERPSTRA entsprechen. Sie sollten nach seinen

Versuchen unfähig sein, sich auf den Genitalschleimhäuten des nicht graviden Rindes zu vermehren. Er stellte die These auf, daß diese Stämme nach oraler Infektion über eine vorübergehende Bakteriämie in der Plazenta haften und somit einen Abort auslösen können; er nannte sie Vibrio fetus Typ intestinalis und demgegenüber die Erreger der eigentlichen Genitalvibriose Vibrio fetus Typ venerealis (Gruppe I nach TERPSTRA). Diese Einteilung hat im Laufe der folgenden Jahre weite Anerkennung gefunden, sie ist auch der entsprechenden Schrift der FAO (Ed. J.A. LAING 1960) zugrunde gelegt worden.

Als weiteres wichtiges biochemisches Unterscheidungsmerkmal neben der schon von TERPSTRA erwähnten H_2S-Bildung gilt die Prüfung der Glycin-Toleranz, die ursprünglich von LECCE (1958) zur Unterscheidung boviner und oviner Stämme angegeben wurde. Mehrere Autorengruppen haben diese beiden Kriterien ihren Einteilungen von Vibrio fetus-Stämmen zugrunde gelegt. So unterschieden PARK et al. (1962) einen Typ A, der kein Wachstum in Nährböden mit 1% Glycin-Zusatz sowie keinerlei H_2S-Bildung zeigt, von einem Typ B, der in Gegenwart von Glycin wächst und in Nährböden mit Cystin-Zusatz auch H_2S bildet. Sie wiesen jedoch nach, daß auch der Typ B, welcher dem Typ intestinalis nach FLORENT entspricht, im Rindergenitaltrakt überleben kann, und nahmen im Gegensatz zu FLORENT an, daß auch Typ B Erreger der Vibriosis genitalis sein könne. Dies wurde später auch von FLORENT et al. (1964) eingeräumt, jedoch nicht als Regelfall angesehen, aus tierseuchenhygienischen Gesichtspunkten soll nach WINKENWERDER (1965) jedenfalls

nur die Bekämpfung von Typ venerealis notwendig sein.

BRYNER et al. (1962) unterschieden ebenfalls mit der Prüfung der H_2S-Bildung und der Glycin-Toleranz zwei Typen 1 und 2, die den Typen A und B nach PARK entsprechen, und wiesen auf eine unterschiedliche Neigung der Typen zur Bildung bestimmter Kolonieformen hin. Daneben unterschieden sie noch einen selteneren Subtyp 1, der sich in Glycin-Toleranz, Kolonieform und vermutlich auch in der Pathogenität wie Typ 1, in der H_2S-Bildung wie Typ 2 verhielt. In einer späteren Arbeit wiesen sie nach, daß im Intestinaltrakt des Rindes nur Typ 2 überleben kann (BRYNER et al. 1964). MOHANTY et al. (1962) kamen in ihren biochemischen Untersuchungen zu fast den gleichen Ergebnissen, ihre Typen I und II entsprechen den Typen 1 und 2, ihr Typ III dem Subtyp 1 bei BRYNER et al.

Auch PLASTRIDGE et al. (1964) unterschieden bei der Untersuchung von insgesamt 223 Vibrionenstämmen verschiedenster Herkunft unter den katalasepositiven Vibrio fetus-Stämmen drei Gruppen, die jedoch den Gruppen von MOHANTY oder BRYNER nicht ganz gleichzusetzen sind: Gruppe I zeigte keine H_2S-Bildung und negative Glycin-Toleranz, wie etwa Typ 1 von MOHANTY; Gruppe II, welche unter anderem fast alle Stämme menschlicher Herkunft umfaßte, zeigte ebenfalls keine H_2S-Bildung, jedoch positive Glycin-Toleranz und findet damit keine Entsprechung bei den genannten Autoren; die nur kleine Gruppe III soll mit H_2S-Bildung und positiver Glycin-Toleranz Vibrio fetus Typ intestinalis nach FLORENT entsprechen. In der Resistenzprüfung

gegen einige Antibiotica verhielten sich diese Gruppen deutlich different. Die H_2S-Bildung wurde in anderer Weise als bei den übrigen Autoren mit Eisen-Dreizucker-Agar geprüft. RINGEN und FRANK (1963), die sich direkt auf die Nomenklatur von FLORENT stützten, kamen in der Frage der H_2S-Bildung bei der Verwendung von Brucellenagar mit Eisensulfat wiederum zu anderen Ergebnissen: alle Vibrio-fetus-Stämme zeigten hier im Gegensatz zu Vibrio bubulus keinerlei H_2S-Bildung, nur in der Glycin-Toleranz ließen sich die Typen venerealis und intestinalis klar unterscheiden.

Insgesamt läßt sich bei Vernachlässigung kleinerer Unterschiede folgende Gleichsetzung der verschiedenen Nomenklaturen vollziehen:
1. Dem Typ venerealis nach FLORENT entspricht die Gruppe I nach TERPSTRA, der Typ A nach PARK, der Typ 1 nach BRYNER, der Typ I nach MOHANTY, vermutlich auch die Gruppe I nach PLASTRIDGE.
2. Dem Typ intestinalis nach FLORENT entspricht die Gruppe III nach TERPSTRA, der Typ B nach PARK, der Typ 2 nach BRYNER, der Typ II nach MOHANTY, eventuell die Gruppe III nach PLASTRIDGE.
3. Für den zusätzlichen Subtyp 1 nach BRYNER findet sich der Typ III nach MOHANTY, er ist als Seitentyp wohl dem Typ venerealis zuzuordnen.
4. Für die Gruppe II nach PLASTRIDGE läßt sich bei den anderen Autoren keine Entsprechung nachweisen (s. auch Tab. 1, S.9).

Die Abgrenzung der "related vibrios" von Vibrio fetus beruht vor allem auf dem höheren Temperaturoptimum dieser Stämme: nach KING (1957 und 1962) sollen unter der Inkubation bei 25°, 37° und 42°C

Tabelle 1

Die biochemische Typendifferenzierung von Vibrio fetus: Beziehung der Nomenklaturen der verschiedenen Autoren zueinander (s. S. 8).

Autoren	Typenbezeichnung	
a) FLORENT 1959	Typ venerealis	Typ intestinalis
b) AKKERMANS, TERPSTRA und van WAVEREN 1956	Gruppe I	Gruppe III
c) PARK et al. 1962	Typ A	Typ B
d) BRYNER et al. 1962	Typ 1 (Seitentyp: Subtyp 1)	Typ 2
e) MOHANTY et al. 1962	Typ I (Seitentyp: Typ III)	Typ II
f) PLASTRIDGE et al. 1964	Gruppe I (ohne Entsprechung: Gruppe II)	Gruppe III

Vibrio fetus-Stämme nur bei den zwei niedrigeren Temperaturen, die "related vibrios" dagegen nur bei den zwei höheren Temperaturen wachsen können. Außerdem bestehen nach KING geringere morphologische Unterschiede (etwas engere Windungen bei den "related vibrios"), dazu sei die H_2S-Bildung bei einigen, jedoch nicht bei allen "related vibrios" stärker als bei Vibrio fetus. Nach DILIELLO et al. (1959) ist der Unterschied in der H_2S-Bildung bei Prüfung mit Cystin-Zusatz zum Nährboden sehr deutlich, nach WINKENWERDER (1966) ist die H_2S-Bildung bei solchen

"related vibrios" besonders stark, die zur Bildung kokkoider Formen neigen. Die serologischen Untersuchungen mit den "related vibrios" seien vorweggenommen: KING (1962) fand nur geringe Kreuzreaktionen mit Vibrio fetus, DILIELLO et al. (1959) fanden dagegen eine deutliche Verwandtschaft; WINKENWERDER (1966) nahm bei Prüfung mit der Komplementbindungsreaktion (s.S.16) einen eigenen O-Antigentyp für die "related vibrios" an.

Die Klassifizierung von Vibrio fetus nach vorwiegend biochemischen Gesichtspunkten hat auch ihre Kritiker gefunden: beim Vergleich mit serologischen Ergebnissen halten z.B. FIREHAMMER und BERG (1965) die Prüfung der H_2S-Bildung und KAMEL (1960) die Prüfung der Glycin-Toleranz für unzuverlässig; nach WINKENWERDER und MITSCHERLICH (1966) sei mit kulturell-biochemischen Kriterien nur die Zuordnung eines Stammes zur Gruppe Vibrio fetus, Vibrio coli und Vibrio jejuni einerseits oder zur Gruppe Vibrio bubulus und Vibrio metchnikovi andererseits möglich; jede genauere Zuordnung müsse durch serologische Untersuchungen erfolgen. Dennoch hat besonders die Einteilung nach FLORENT wegen ihrer pathogenetischen Bedeutung auch den serologisch orientierten Autoren häufig als Vergleichsbasis gedient.

b) Serologische Methoden

Zur serologischen Differenzierung ist zunächst vor allem die klassische Bakterienagglutination benutzt worden. Die Unterscheidung von Vibrio fetus und Vibrio bubulus ist mit ihr möglich, es ergeben sich zwischen katalasepositiven und -negativen Vibrionen keine oder nur sehr geringe Kreuzreaktionen (HUBRIG und WOHANKA 1956, BIBERSTEIN 1956a, SCHARF 1958). Innerhalb der Art Vibrio fetus hat sie zu wechselnden Ergebnissen geführt. SMITH und TAYLOR (1919) konnten unter 24 Stämmen nur 2 als serologisch different abtrennen, die übrigen 22 verhielten sich homolog. Ähnlich fand BIBERSTEIN (1956a) unter 48 katalasepositiven Stämmen nur 4 abweichende Stämme, die übrigen waren mehr oder weniger stark verwandt. Auch in den Untersuchungen von DILIELLO et al. (1959) bildeten die Vibrio fetus-Stämme mit nur geringen Ausnahmen eine homogene Gruppe. ROLLE (1964) erhielt bei der Untersuchung katalasepositiver Darmvibrionen von Rindern im üblichen Röhrchenagglutinationstest sowie in einem Objektträgerschnelltes drei Typen, von denen nur einer mit Vibrio fetus-Vergleichsstämmen aus dem Genitale verwandt war.

MARSH und FIREHAMMER (1953), die 23 ovine und 3 bovine Vibrio fetus-Stämme untersuchten, konnten diese mittels der Bakterienagglutination in fünf Gruppen aufteilen, von denen die Gruppe III die bovinen Stämme umfaßte. Die ovinen Stämme zerfielen in eine Hauptgruppe I und drei kleinere Nebengruppen II, IV und V, diese Nebengruppen zeigten Beziehungen zur Gruppe III. Diese Einteilung, die sich nach BELDEN und ROBERTSTAD (1965) auch mit der Fluoreszenz-Antikörpertechnik reproduzieren läßt, ist als sogenannte "Montana-

classification" in Nordamerika viel benutzt worden, im europäischen Schrifttum findet sie sich selten. Für ihre physiologische Bedeutung lassen sich einige Belege angeben: FIREHAMMER und BERG (1965) wiesen in Anlehnung an die Versuche von E.O. KING (1962) mit den "related vibrios" eine unterschiedliche Temperaturtoleranz der einzelnen Serotypen nach; nach OGG (1962) ist auch die Neigung zur Bildung kokkoider Formen in der Kultur bei den einzelnen Serotypen verschieden; nach Impfversuchen von MILLER et al. (1964) besteht bei Schafen keine Kreuzimmunität zwischen Typ I und Typ V.

Auch bei der Erweiterung der Bakterienagglutination durch Absättigungsversuche ergaben sich keine konstanten Ergebnisse: REICH et al. (1961) nahmen bei der genauen Analyse von 5 bovinen Vibrio fetus-Stämmen 12 verschiedene Antigenfraktionen an, SCHARF (1958) fand bei 13 Vibrio fetus-Stämmen nur eine angedeutete Untergruppierung.

Die Schwierigkeiten bei der Bakterienagglutination, die in den bisher genannten Arbeiten vor allem mit sogenanntem Voll- oder OH-Antigen und den entsprechenden Seren durchgeführt wurde, führten zu prinzipiellen Untersuchungen über den Antigenaufbau von Vibrio fetus. WIIDIK und HLIDAR (1955) wiesen nach, daß man bei Vibrio fetus neben dem O- und H-Antigen auch mit dem Auftreten von einem Kapsel- oder K-Antigen rechnen muß, welches die Agglutination des somatischen oder O-Antigens verhindern kann; es wird erst durch längeres Erhitzen bei 120°C, noch nicht bei 100°C zerstört. BOND (1957) zeigte außerdem, daß Glatt-, Rauh- und

Schleimformen von Vibrio fetus sich in ihrem Antigenaufbau erheblich unterscheiden und verschieden starke Kreuzreaktionen bedingen können. RISTIG (1957) untersuchte den Einfluß von Hitze und Formalin auf die Antigenaktivität, er bestätigte sowohl die These vom K-Antigen als auch die serologischen Unterschiede der verschiedenen Koloniefomen, weiter wies er darauf hin, daß man bei der Verwendung von Rauhformen mit dem Auftreten von Spontanagglutination rechnen muß. BIBERSTEIN (1956b) machte darauf aufmerksam, daß die Agglutinabilität der Stämme auch von der Dauer ihrer Wachstumsinkubation abhängig ist. Nach MITSCHERLICH und HEIDER (1968) kann es bei älteren Vibrio fetus-Kulturen auch zu einer spontanen Umwandlung des O-Antigens kommen, die sich durch Hinzufügung homologer Immunseren zum Kulturmedium provozieren läßt (Umwandlung des O-Antigentyps 1 der später zu besprechenden Komplementbindungsreaktion in den O-Antigentyp 2, jedoch nie umgekehrt).

In der Analyse des Antigenaufbaus der einzelnen Stämme war zunächst das H-Antigen von besonderem Interesse. GALLUT (1952) untersuchte 10 Vibrio fetus-Stämme zuerst mit der Bakterienagglutination, diese ergab kein einheitliches Bild; anschließend isolierte er mittels Phenolextraktion zwei Antigenfraktionen: die eine, aus Polysacchariden bestehende, erwies sich als stammspezifisch, die andere, aus Proteiden bestehende, war bei 9 von 10 Stämmen identisch, sie dürfte dem H-Antigen zuzurechnen sein. Als Untersuchungsmethoden dienten Präzipitations- und Flocculationsteste. Die spätere Prüfung von 20 weiteren Vibrionenstämmen zeigte ähnliche Ergebnisse (GALLUT et al. 1957). Auch WINTER und DUNNE (1962)

sowie WINTER (1963) kamen bei ihren später genauer zu besprechenden Untersuchungen (s. S. 17f) zu der Annahme eines fast allen Vibrio fetus-Stämmen gemeinsamen, hitzelabilen Oberflächenantigens. MORGAN (1959) nahm bei der Untersuchung mit H-Seren und deren weiteren Absättigungen ebenfalls ein gemeinsames H-Antigen für alle Vibrio fetus-Stämme an, daneben unterschied er jedoch noch typspezifische und stammspezifische H-Antigenanteile.

Insgesamt ist festzustellen, daß es keine allgemein anerkannte Einteilung der H-Antigene und somit auch keine auf ihr basierende Einteilung von Vibrio fetus gibt. Es wird im Gegenteil von einigen Autoren (z.B. MORGAN 1959) empfohlen, darauf zu achten, daß bei serologischen Klassifizierungsuntersuchungen das H-Antigen sicher zerstört ist, um so verwischende Kreuzreaktionen sicher zu vermeiden.

Die O-Antigenanalyse von Vibrio fetus ist anfangs auch mit der Bakterienagglutination (O-Antigen gegen O- oder OH-Seren) durchgeführt worden. WIIDIK und HLIDAR (1955) fanden nur wenige Kreuzreaktionen, jedoch auch nur geringe homologe Titer. BIBERSTEIN (1956a) erhielt bei der Verwendung von O-Antigen gegenüber dem OH-Antigen keine wesentlich spezifischeren Ergebnisse. PRICE et al. (1955) vermuteten bei der Untersuchung von 16 Vibrio fetus-Stämmen (unter Verwendung von O-Antigen, O-Seren und Absättigungsversuchen) mindestens 5 verschiedene, sich überschneidende O-Antigene. MORGAN (1959) inaktivierte das H-Antigen durch zwei Stunden langes Kochen im Rückflußkondensor, bei Verwendung von derart präparierten O-Antigenen und den entsprechenden

O-Seren konnte er 25 Stämme in zwei Gruppen zu 18 und 7 Stämmen aufteilen.

Um den Schwierigkeiten der Bakterienagglutination zu entgehen, haben MITSCHERLICH und andere seit 1958 die Komplementbindungsreaktion zur Differenzierung des O-Antigens von Vibrionen angewandt. Die genaue Technik beschreibt KAMEL (1960), es wurde eine in Phenol lösliche, auf 80° erhitzte, durch Dialyse wieder vom Phenol befreite Antigenfraktion verwendet. MITSCHERLICH und LIESS (1958) unterschieden zunächst unter den Vibrio fetus-Stämmen zwei O-Antigentypen (1 und 2) und unter den Vibrio bubulus-Stämmen ebenfalls zwei Typen (3 und 4); durch weitere Untersuchungen über das kulturelle Verhalten und die Pathogenität ließ sich zeigen, daß Typ 1 mit Typ venerealis und Typ 2 mit Typ intestinalis nach FLORENT praktisch identisch sind (MITSCHERLICH 1961). Die unterschiedliche Tierpathogenität dieser beiden Typen hat WINKENWERDER (1966) noch einmal folgendermaßen charakterisiert: O-Antigentyp 1 (oder Typ venerealis):"Erreger der enzootischen Sterilität und von Aborten des Rindes sowie von Aborten beim Schaf." O-Antigentyp 2 (oder Typ intestinalis): "Erreger der bakteriämischen und mit Abort verlaufenden Schafvibriosis und von Aborten des Rindes."

Im Laufe der folgenden Jahre wurden auch Schweine-, Pferde- und Hühnervibrionen sowie humane Vibrio fetus-Stämme einschließlich der "related vibrios" in die Untersuchungen mit der Komplementbindungsreaktion einbezogen und die Liste der 4 O-Antigentypen bis auf 13 im Jahre 1967 erweitert (KAMEL 1960, MACIAK und WINKENWERDER

1964, WINKENWERDER und BÖTTCHER 1965, SIECK 1965, WINKENWERDER 1966 und 1967); eine vorläufige Übersicht geben WINKENWERDER und MITSCHERLICH (1966).

Von diesen 13 O-Antigentypen gehören zu Vibrio fetus im engeren Sinne die Typen 1, 2, 7 und 13. Der Typ 7 wurde von KAMEL (1960) gefunden, er zeigte bei einem Teil der Stämme eine Verwandtschaft zum Typ 2. Bei einer Untersuchung von fünf Vergleichsstämmen der "Montana classification" durch WINKENWERDER (1967) ließen sich die Montana-Serotypen V und III-II dem O_Antigentyp 1, die Typen II und V-III dem O-Antigentyp 2 zuordnen. Der Typ I, welcher die Hauptgruppe der Erreger der Schafvibriose in Nordamerika umfaßt (s. S. 11), fand keine Entsprechung, er wurde als neuer O-Antigentyp 13 aufgenommen. Eine wesentliche Rolle scheinen in Europa jedoch nur die Typen 1 und 2 in der Veterinärmedizin zu spielen. Auch bei der Untersuchung von sieben humanen Vibrio fetus-Stämmen konnte WINKENWERDER (1966) drei Stämme dem O-Antigentyp 1 und vier dem O-Antigentyp 2 zuordnen, während für sieben humane "related vibrios" nach diesen Untersuchungen ein eigener O-Antigentyp anzunehmen war (s. auch S. 10).

Trotz ihres relativ komplizierten Arbeitsganges wird die Komplementbindungsreaktion wegen ihrer zuverlässigen Resultate heute schon als Routineverfahren in der veterinärmedizinischen Vibrionendiagnostik verwendet (s. z.B. VAHLENKAMP 1965). Die durch diese Methode aufgestellte O-Antigentypisierung in der Nomenklatur nach WINKENWERDER und MITSCHERLICH (1966) gilt auch in der vorliegenden Arbeit als Bezugspunkt.

3. Bisherige Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination an Vibrio fetus.

Im Gegensatz zu Vibrio bubulus liegen bei Vibrio fetus schon einige Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination vor. Zuerst von KEOGH et al. (1947 und 1948) für Influenzabakterien angegeben, später vor allem von NETER für die Diagnostik der Enterobacteriaceae weiter entwickelt (s. die Übersicht von NETER 1956), ist diese Methode vermutlich zuerst von BIBERSTEIN (1956a) bei Vibrio fetus angewandt worden. In Anlehnung an das ursprüngliche Verfahren von NETER et al. (1952) wurden die Vibrionen nach Erhitzen als Gesamtsuspension an Schaferythrozyten angelagert und diese (nach Auswaschen) mit Verdünnungsreihen von Kaninchenimmunseren 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Röhrchen danach direkt abgelesen. Bei der genauen Prüfung von 6 katalasepositiven Stämmen und den entsprechenden Seren sowie bei der orientierenden Durchuntersuchung von 50 weiteren Seren mit 10 Stämmen, nur in der Serumverdünnung 1:10, ergaben sich etwas seltenere Kreuzreaktionen als in der OH-Bakterienagglutination, so daß sich aus der Hauptgruppe von 44 Stämmen (s. S. 10) zwei Stämme ausgliedern ließen; Gesichtspunkte für eine weitere Aufteilung der Stämme ergaben sich jedoch nicht.

RISTIC und BRANDLY (1959) isolierten in einem langwierigen Extraktionsprozeß aus Vibrio fetus eine Antigenfraktion, "HS" genannt, welche durch zweistündiges Kochen in Aqua dest. aus den Vibrionen herausgelöst und von alkohollöslichen Anteilen durch Präzipitation befreit wurde; chemisch bestand sie aus Pentosen und sieben verschiedenen

Aminosäuren. Die Autoren verwendeten dieses Antigen in einem Agglutinationsinhibitionstest, in der indirekten Hämagglutination (Anlagerung des Antigens an Schaferythrozyten, Inkubation mit den Serumverdünnungen für 2 1/2 Stunden bei Raumtemperatur), später auch in einem Hämolysetest (RISTIC und WALKER 1960) und in einem Gelpräzipitationstest auf dem Objektträger (RISTIC und MURTY 1961, PILCHARD und RISTIC 1963). Bei "HS"-Präparationen tierischer Stämme ergaben sich zwei unterschiedliche Typen, menschliche Stämme zeigten mit ihnen keine Gemeinsamkeiten (RISTIC und BRANDLY 1959). RISTIC konzentrierte seine Untersuchungen vor allem auf die Analyse von Immun- und Rinderseren auf spezifische Antikörper, weniger auf die Differenzierung einzelner Stämme.

WINTER und DUNNE (1962) benutzten in ihren schon erwähnten Versuchen (s. S. 12f) Antigenfraktionen aus Vibrio fetus, die sie durch Ultraschallbehandlung bzw. Phenolextraktion (Verwendung der wasserlöslichen Phase) gewonnen hatten, zur Agargelpräzipitation und zur indirekten Hämagglutination. Die Anlagerung dieser Antigene an Erythrozyten gelang nur nach deren Vorbehandlung mit Tanninsäure. Die Antigenfraktionen erwiesen sich als hitzelabil. Phenolextrakte aus Vibrio fetus-Stämmen reagierten auch mit Vibrio bubulus-Seren, so daß die Autoren zur Annahme gemeinsamer hitzelabiler Antigene von Vibrio fetus und Vibrio bubulus kamen. Bei der chromatographischen Analyse des Ultraschallantigens (WINTER 1963) zeigte es sich, daß gerade die am weitesten verbreitete Antigenfraktion bei Testung in der indirekten Hämagglutination nicht mit O-Seren reagierte und so vermutlich dem H-Antigen zuzurechnen war.

Später benutzte WINTER (1965, 1966) eine andere Extraktionsmethode (Acetontrocknung, aufeinanderfolgende Extraktion mit Trichloressigsäure und Phenol) zur Darstellung des sogenannten Endotoxins. Die Anlagerung dieses Antigens an Schaferythrozyten gelang erst nach Erhitzen in 0,02 N NaOH-Lösung, die chemische Analyse ergab ein fast reines Lipopolysaccharid. Die indirekte Hämagglutination mit homologen Immunseren ergab Titerwerte bis 1:20 000.

Bei der Verwendung von Rinderseren stieß WINTER (1965) auf die Erscheinung, daß in der indirekten Hämagglutination auch bei sicher nicht infizierten Kühen positive Reaktionen auftraten, wenn die Tiere über 9 Monate alt waren. Zu einem ähnlichen Ergebnis war schon TE PUNGA gekommen, der erhitzte Vibrionensuspensionen an Schaferythrozyten anlagerte und diese sensibilisierten Erythrozyten, die bei geeigneter Lagerung über 6 Monate lang verwendungsfähig waren (TE PUNGA 1959), zum Antikörpernachweis bei Kühen verwendete: mit Vaginalschleim erhielt er zuverlässige Ergebnisse (TE PUNGA 1958), mit Seren von über 15 Monate alten Kühen dagegen unspezifisch positive Reaktionen (TE PUNGA und MOYLE 1961). Demgegenüber hatten RISTIC und BRANDLY (1959) mit ihrer Methode (s. S. 16f) bei der Prüfung von 12 Rinderseren durchaus brauchbare Resultate erhalten.

DENNIS (1959) isolierte mit der Phenolextraktionsmethode nach WESTPHAL ein Lipopolysaccharid aus Vibrio fetus und testete dieses in der indirekten Hämagglutination mit Kaninchenimmunseren und in Toxizitätsversuchen. Über die Rolle dieses Endotoxins und der Endotoxine anderer gramnegativer Bakterien in der Pathogenese von Aborten hat er später referiert (DENNIS 1966).

NEWSAM et al. (1967) sensibilisierten einerseits tannierte Schaferythrozyten mit phenollöslichen Extrakten, andererseits nicht tannierte Schaferythrozyten mit hitzestabilen Extrakten aus Vibrio fetus Typ venerealis; mit beiden Methoden ließ sich der Antikörpernachweis im Vaginalschleim infizierter Kühe durch die indirekte Hämagglutination führen.

Zum Antikörpernachweis ist die indirekte Hämagglutination auch schon bei Fällen von menschlicher Vibriosis verwendet worden: WHEELER und BORCHERS (1961) erhielten bei einem Kind mit Vibrionenenteritis einen Serumtiterwert von 1:64 (Verwendung von menschlichen, mit Trypsin vorbehandelten O-Erythrozyten, Anlagerung des Überstandes gekochter Vibrionen). DARRELL et al. (1967) erhielten mit ähnlicher Methode bei einem 28jährigen Mann mit Vibrionensepsis ebenfalls einen Serumtiterwert von 1:64. BOKKENHEUSER (1968) fand bei seinen Fällen Titerwerte zwischen 1: 400 und 1: 3 200, jedoch ließen sich auch in einigen Seren gesunder Personen erhöhte Titerwerte nachweisen.

B EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

Es wurden von 6 Vibrio fetus- und 2 Vibrio bubulus-Stämmen Kaninchenimmunseren (OH-Seren) hergestellt und mit diesen 8 Seren insgesamt 10 Vibrio fetus- und 5 Vibrio bubulus-Stämme mittels der indirekten Hämagglutination, der OH- und O-Bakterienagglutination sowie in Absättigungsversuchen untersucht.

Von den 15 Stämmen waren 10 vom Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen (Direktor Prof. Dr. E. Mitscherlich) und 4 vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Direktor Prof. Dr. K. Wagener) zur Verfügung gestellt worden. Sie stammten aus tierischem Material, während der Stamm Vibrio fetus Tübingen 1964 aus dem Liquor eines Säuglings mit Meningitis (BADER et al. 1966) gezüchtet worden war. Alle Stämme waren schon mit der Komplementbindungsreaktion untersucht und in die Klassifizierung der Vibrionen nach ihren O-Antigenen nach WINKENWERDER und MITSCHERLICH (1966) eingestuft worden (jeweils durch Untersuchungen in ihren Herkunftsinstituten, der Stamm Vibrio fetus Tübingen 1964 durch Untersuchungen am Göttinger Institut). Die Tabelle 2 (S. 22) gibt eine Übersicht über die Stämme, ihre Herkunft und ihre Klassifizierung.

Die Stämme wurden auf KLIGLER-Agar (5ml-Schrägröhrchen) in evakuierten ZEISSLER-Töpfen bei 37°C gehalten und alle 7-10 Tage überimpft. Zur Antigengewinnung wurden 15ml-Schrägröhrchen mit KLIGLER-Agar

Tabelle 2

Übersicht über die verwendeten Vibrio fetus- und Vibrio bubulus-Stämme. Von den mit "Se" gekennzeichneten Stämmen wurden die Kaninchenimmunseren hergestellt.

Stamm-bezeichnung	Art	O-Antigentyp nach KBR	Herkunftsmaterial	Herkunftsinstitut
266 (Se)	fetus	1	Vaginalspülprobe einer Kuh	Göttingen
264 (Se)	fetus	1	Labmagen eines Rinderfetus	Göttingen
Pb 242 (Se)	fetus	1	Rind	Hannover
233 (Se)	fetus	2	Schafsfetus	Göttingen
245 (Se)	fetus	2	Rinderfetus	Göttingen
DT 74	fetus	2	Vaginalspülprobe einer Kuh	Göttingen
L	fetus	2	Schafsfetus	Göttingen
239	fetus	2	Schafsfetus	Göttingen
Vibrio fetus Tübingen 1964	fetus	2	Liquor eines Säuglings	Tübingen
S 16 (Se)	fetus	7	Vaginalspülprobe einer Kuh	Göttingen
180 (Se)	bubulus	3	Rind	Göttingen
B 785	bubulus	3	Rind	Hannover
S 42	bubulus	4	Vaginalspülprobe einer Kuh	Hannover
270 (Se)	bubulus	5	Vaginalspülprobe einer Kuh	Göttingen
U 15	bubulus	8	Pferd	Hannover

beimpft und bei gutem Wachstum nach 4-6 Tagen mit je 2ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde durch Gram-präparat auf Reinheit kontrolliert, für die indirekte Hämagglutination in dieser Konzentration autoklaviert, zur Immunisierung und für die Bakterienagglutinationen um etwa das dreifache (je nach Dichte der Suspension) weiter verdünnt.

Zur Gewinnung der Seren wurden 8 Kaninchen mit je 4 intravenösen Injektionen von lebenden Vibrionen im Abstand von 3-4 Tagen mit ansteigenden Dosen (0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 ml der obengenannten Suspension) immunisiert und eine Woche nach der letzten Injektion entblutet; die Seren wurden bei 4°C aufbewahrt. Welche Stämme zur Immunisierung benutzt wurden, ist aus Tabelle 2 (S. 22) zu entnehmen.

Die Bakterienagglutinationsreaktionen wurden in Anlehnung an SOEDERLIND (1961) als Röhrchentest im 37°C-Wasserbad für 16 Stunden durchgeführt, nach Zugabe von je 0,5 ml Bakteriensuspension zu 0,5 ml Serumverdünnung mit Serumkonzentrationen in geometrischer Reihe von 1:50 bis 1:12 800 (Endkonzentration), dazu jeweils eine Antigenkontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung. Als Titerwert wurde der reziproke Wert der Serumkonzentration mit der letzten noch vollständigen Agglutination und klarem Überstand bezeichnet. Zur sogenannten OH-Agglutination (abgekürzt OHA) wurden Suspensionen lebender Bakterien in Physiologischer Kochsalzlösung benutzt, zur O-Agglutination (OA) wurden die Bakteriensuspensionen vorher 1 Stunde bei 120°C autoklaviert.

Für die indirekte Hämagglutination wurde die von NETER für die Enterobacteriaceae angegebene Methode (in ihrer späteren Form, NETER et al. 1956b) in der Modifikation des Tübinger Hygieneinstituts benutzt (BADER 1964, KIENINGER 1964). Zur Herstellung des Antigens wurden die abgeschwemmten Bakteriensuspensionen 1 Stunde bei 120°C autoklaviert (in den Vorversuchen zum Vergleich auch einer anderen Temperaturbehandlung unterworfen, s. S. 28), anschließend 1 Stunde bei 3 000 U/min. zentrifugiert und der Überstand als Antigenstammlösung verwendet. Defibriniertes Hammelblut wurde 3 x 10 Min. bei 3 000 U/min. zentrifugiert, jeweils der Überstand verworfen und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, zum Schluß auf 1:500 verdünnt. Diese Erythrozytensuspension wurde zur Anlagerung des Antigens zu gleichen Teilen mit Antigenlösung (die eventuell vorher mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, s. die Vorversuche auf S. 26) versetzt und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Um das nicht an die Erythrozyten gebundene Antigen auszuwaschen, wurde das Gemisch anschließend 3 x 3 Min. bei 3 000 U/min. zentrifugiert, jeweils der Überstand verworfen und mit physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgefüllt.

Zur Durchführung der eigentlichen Hämagglutination wurden von dieser Suspension sensibilisierter Erythrozyten je 0,5 ml zu je 0,5 ml Serumverdünnung gegeben, die Konzentrationen der Serumverdünnungsreihen entsprachen denen der Bakterienagglutination (s. S. 23). Die Röhrchen wurden 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend 3 Min. bei 3 000 U/min. zentrifugiert und unter Aufschütteln jedes einzelnen Röhrchens abgelesen.

Als Kontrollen dienten ein Röhrchen mit 0,5 ml sensibilisierter Erythrozyten und 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung sowie ein Röhrchen mit 0,5 ml nicht sensibilisierter Erythrozyten und 0,5 ml Serum in der Endkonzentration 1:50, diese Kontrollen durften keinerlei Agglutination zeigen. Als Titerwert des Serums (bzw. bei der Antigentitration des Antigens, s. S. 26) wurde die letzte noch vollständige Agglutination angegeben, wobei insbesondere beim Aufschütteln der Überstand über dem Erythrozytenagglutinat klar bleiben mußte (dreifach positive Reaktion).

Bei Benutzung frischer Seren wurden in hochtitrig positiven Serumverdünnungsreihen zum Teil Hämolysereaktionen in den Röhrchen starker Serumkonzentration (bis maximal 1:400) beobachtet. Sie lagen jedoch immer um mindestens drei Verdünnungsstufen unter den letzten Röhrchen mit positiver Hämagglutination und waren außerdem bei zwei Wochen alten Seren nicht mehr nachzuweisen, sodaß sich eine Inaktivierung der Seren erübrigte.

In Absättigungsversuchen wurde die benötigte Serummenge in der Verdünnung 1:25 mit dem Sediment eines Bakterienzentrifugates versetzt (zur Herstellung von reinen H-Seren mit Bakterien, die 1 Stunde bei 120°C autoklaviert worden waren) und 4 1/2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 1 Stunde bei 3 000 U/min. zentrifugiert und der Überstand als Serumstammlösung verwendet. Als Absättigungskontrolle galt der negative Ausfall der OH- bzw. O-Bakterienagglutination dieses Serums mit dem zur benutzten Stamm.

2. Ergebnisse

a) Vorversuche zur indirekten Hämagglutination mit Vibrio fetus

In den Vorversuchen wurden nur jeweils homologe, zum selben O-Antigentyp gehörende Stämme und Seren von Vibrio fetus benutzt. Es wurde zunächst die Antigentitration der Antigenstammlösungen in der indirekten Hämagglutination durchgeführt. Tabelle 3 zeigt ein typisches Beispiel einer solchen zweidimensionalen Titration, bei der die Erythrozyten mit fünf verschie-

Tabelle 3

Beispiel für die Bestimmung des Antigengehaltes der Antigenstammlösungen in der indirekten Hämagglutination durch zweidimensionale Titration (Antigen 239 (2) gegen Serum 233 (2)). Die gestrichelte Linie trennt die positiv gewerteten Reaktionen (s. S. 25) von den negativen.

	Serumkonzentration (reziproker Wert) 50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	Serumtiterwert
Antigenkonzentration										
1:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	Ø	Ø	1600
1:4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	Ø	Ø	1600
1:16	+++	+++	+++	+++	+++	++	Ø	Ø	Ø	800
1:64	+++	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	50
1:256	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	1:50 Ø
Antigentiterwert	1:64	1:16	1:16	1:16	1:16	1:4	1:1 Ø	1:1 Ø	1:1 Ø	

den starken Verdünnungen der zu prüfenden Antigenstammlösungen sensibilisiert wurden und dann mit fünf Serumverdünnungsreihen eines homologen Serums die indirekte Hämagglutination durchgeführt wurde. Von den sich zu jeder Serumverdünnungsstufe ergebenden Antigentiter-

werten galt derjenige als "Kenntiterwert" der Antigenstammlösung, der mit der höchsten noch positiven Serumverdünnungsstufe ermittelt wurde (im Beispiel 1:4 bei der Serumverdünnung 1:1 600). Dieser "Kenntiterwert" der Antigenstammlösungen lag meist zwischen 1:4 und 1:64, eine jeweils doppelt so starke Konzentration wurde dann in den in Frage kommenden Vorversuchen und in den Hauptversuchen weiter verwendet. Einzelne Antigenchargen, deren "Kenntiterwert" unter 1:4 lag, wurden nicht weiter verwendet, sondern die Antigengewinnung wiederholt.

Der Ausfall der Serumtiterwerte auf Tabelle 3 ist ebenfalls typisch für die zweidimensionale Titration: sie bleiben im Bereich starker Antigenkonzentrationen zunächst gleich hoch, um bei Verdünnung des Antigens über den "Kenntiterwert" hinaus rasch niedriger zu werden. Eine Erhöhung der Serumtiterwerte bei zunehmender Verdünnung der Antigenlösungen wurde nicht beobachtet. Es ist anzunehmen, daß durch die dreimalige Auswaschung der Erythrozyten nach der Sensibilisierung (s.S. 23) eine Hemmung der Hämagglutination durch überschüssiges Antigen verhindert wurde. Dafür spricht auch ein Versuchsansatz (Tabelle 4), in dem unter sonst gleichen Bedingungen nur die Anzahl der Auswaschungen der sensibilisierten Erythrozyten verändert wurde: erst bei

---

Tabelle 4

Serumtiterwerte eines Antigens in der indirekten Hämagglutination gegen das homologe Serum in einem Versuchsansatz, in dem nur die Anzahl der Auswaschungen der Erythrozyten nach der Sensibilisierung verändert wurde (s. Text).

	Anzahl der Auswaschungen			
	1x	2x	3x	4x
Antigen S 16 (7) gegen Serum S 16	800	1600	3200	3200

dreimaliger Auswaschung wurde der höchste Titerwert erreicht.

In weiteren Versuchen wurde die Temperaturbehandlung bei der Herstellung des Hämagglutinationsantigens variiert. Wie Tabelle 5 zeigt, ließ sich nur durch Autoklavieren bei 120°C eine brauchbare Antigenlsöung erzielen. Als Antigenlösung wurde, wie in der Methodendarstellung angegeben, der Überstand der nach der Temperaturbehandlung zentrifugierten Bakteriensuspension verwendet (s. S. 23).

Tabelle 5

Serumtiterwerte in der indirekten Hämagglutination von Antigenlösungen, die unter verschiedener Temperaturbehandlung hergestellt wurden.

	Temperaturbehandlung:			
	3 Tage-4°C	3 Tage-20°C	3 Tage-56°C	1 Stunde-120°C
Antigen 245 (2) gegen Serum 245	1:50 Ø	1:50 Ø	1:50 Ø	3200

In einem anderen Versuchsansatz wurde der Mechanismus der Hitzeeinwirkung studiert. Eine Bakterienlösung wurde nach dreitägigem Stehen bei 20°C in zwei Teile geteilt, und diese wurden einem verschiedenen Vorgehen bei der Herstellung der Antigenstammlösung unterworfen. Teil A wurde wie üblich erst autoklaviert, dann zentrifugiert und davon der Überstand verwendet; Teil B wurde erst zentrifugiert und dann der Überstand allein autoklaviert (Zentrifugation bei 3 000 U/min., Autoklavierung 1 Stunde bei 120 C). Tabelle 6 (S. 29) zeigt die Antigentiterwerte aus der zweidimensionalen Titration beider Antigenstammlösungen mit dem Eigenserum. Teil B hat eine deutliche Aktivität, diejenige

Tabelle 6

Antigentiterwerte (reziproke Werte) in der indirekten Hämagglutination aus der zweidimensionalen Titration von zwei Antigenpräparationen, die aus einer Bakteriensuspension auf verschiedenem Wege hergestellt wurden (Teil A: übliche Antigenpräparation, Teil B: nachträglich autoklavierter Überstand, s. Text). Geprüft wurde Antigen S 16 gegen Serum S 16 (7).

	Serumkonzentration:								
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
Antigen:									
Teil A	64	64	64	16	16	16	16	1:1Ø	1:1Ø
Teil B	16	16	4	4	4	1	1	1:1Ø	1:1Ø

von Teil A ist nur etwa achtmal stärker. Wenn man auch damit rechnen muß, daß in dem Überstand von Teil B noch suspendierte Bakterien enthalten waren, so dürften diese in quantitativer Hinsicht die Aktivität des Antigens nicht erklären. Es wäre denkbar, daß außerdem durch die Hitze noch Antigen aktiviert wurde, das bereits in Kälte, jedoch in inaktiver Form, in Lösung gegangen war.

Außerdem wurde noch ein Vergleich der Reaktionen von reinen H-Seren (Herstellung s. S. 25) und von OH-Seren in der indirekten Hämagglutination mit Antigen des Eigenstamms (übliche Herstellung) durchgeführt; zusätzlich wurde auch die Bakterienagglutination mit OH- und O-Antigen geprüft (Tabelle 7, S. 30). Die indirekte Hämagglutination und die Bakterienagglutination mit O-Antigen verlief mit den H-Seren negativ, während die Bakterienagglutination mit OH-Antigen nur eine Titersenkung gegenüber der Reaktion des OH-Serums erfuhr.

Die Antigenlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt,

Tabelle 7

Serumtiterwerte von OH-Seren und reinen H-Seren gegen den Eigenstamm in der indirekten Hämagglutination (mit üblichem Antigen) sowie in der Bakterienagglutination mit OH- und O-Antigen.

		Agglutinationsverfahren:		
		IHA	Bakterienagglutination mit OH-Antigen	O-Antigen
Antigen:	Serum:			
266 (1)	266 (1) a) OH-Serum	1600	3200	400
	b) reines H-Serum	1:50 Ø	200	1:50 Ø
S 16 (7)	S 16 (7) a) OH-Serum	6400	1600	200
	b) reines H-Serum	1:50 Ø	400	1:50 Ø

---

sie zeigten bei Nachprüfung nach 6 Monaten noch dieselben Titerwerte.

b) Hauptversuche zur serologischen Differenzierung von Vibrio fetus- und Vibrio bubulus-Stämmen

In den Hauptversuchen wurde mit den verfügbaren 15 Stämmen und 8 Seren die indirekte Hämagglutination, die OH- und die O-Bakterienagglutination durchgeführt. Innerhalb der Vibrio fetus-Stämme und -Seren wurde systematisch jede Reaktion angesetzt. Mit den Vibrio bubulus-Stämmen und -Seren sowie in den übergreifenden Reaktionen zwischen Vibrio fetus und Vibrio bubulus wurden die indirekte Hämagglutination und die OH-Bakterienagglutination orientierend durchgeführt; auf die O-Bakterienagglutination wurde hier verzichtet, da Vibrio bubulus-Bakterien nach dem Autoklavieren häufig zur Spontanagglutination neigten und deshalb reproduzierbare Ergebnisse nicht gewährleistet waren.

Die Tabellen 8 a-d (S. 32 bis 35) zeigen die Ergebnisse. Es sei vorweggenommen, daß der einzige Stamm S 16 vom O-Antigentyp 7 der Komplementbindungsreaktion und das zugehörige Serum sich weder in der indirekten Hämagglutination noch in den Bakterienagglutinationen von den Stämmen und Seren des O-Antigentyps 2 abtrennen ließ und Absättigungsversuche (s. S. 38) ebenfalls keine Unterschiede zeigten. Daher wurden die Stämme der O-Antigentypen 2 und 7 in einen homologen Hämagglutinationstyp 2 zusammengefaßt, während der Hämagglutinationstyp 1 dem O-Antigentyp 1 der Komplementbindungsreaktion entsprach. Die Hämagglutinationstypen werden im Folgenden und auf den Tabellen 8-10 kurz als Typen bezeichnet. Tabelle 8 a (S. 32) umfaßt die Ergebnisse mit den Antigenen des Typs 1, die Tabellen 8 b und c (S. 33 und 34) mit den Antigenen des Typs 2 und Tabelle 8 d (S. 35) mit den Vibrio bubulus-Antigenen. Die

Tabelle 8a

Titerwerte in der indirekten Hämagglutination (IHA), der OH- und O-Bakterienagglutination (OHA und OA) zwischen den verfügbaren Seren und den Antigenen des Typs 1 (in Klammern der O-Antigentyp nach der Komplementbindungsreaktion). Die homologen Reaktionen sind gesondert eingerahmt.

	Antigene		
Seren:	266 (1)	264 (1)	Pb 242 (1)
Se 266 (1) IHA	1600	800	200
OHA	3200	100	1600
OA	400	200	400
Se 264 (1) IHA	400	800	200
OHA	800	400	400
OA	200	200	200
Se Pb 242 (1) IHA	800	1600	800
OHA	1600	400	800
OA	400	200	400
Se 233 (2) IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	Ø	Ø
OA	Ø	Ø	Ø
Se 245 (2) IHA	Ø	Ø	50
OHA	Ø	Ø	100
OA	Ø	Ø	100
Se S 16 (7) IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	50	Ø	50
OA	Ø	Ø	50
Se 180 (3) IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	Ø	50
Se 270 (5) IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	Ø	50

Tabelle 8b

Titerwerte in der indirekten Hämagglutination (IHA) der OH- und O-Bakterienagglutination (OHA und OA) zwischen den verfügbaren Seren und Antigenen des Typs 2 (in Klammern der O-Antigentyp nach der Komplementbindungsreaktion). Die homologen Reaktionen sind gesondert eingerahmt.

Seren:	Antigene: 233 (2)	245 (2)	DT 74 (2)	L (2)
Se 266 (1) IHA	50	Ø	Ø	50
OHA	200	100	50	100
OA	100	50	50	50
Se 264 (1) IHA	50	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	50	Ø	50
OA	50	Ø	Ø	50
Se Pb 242 (1) IHA	Ø	Ø	Ø	Ø
OHA	50	50	Ø	Ø
OA	Ø	Ø	Ø	Ø
Se 233 (2) IHA	3200	1600	3200	800
OHA	1600	800	400	400
OA	200	200	200	400
Se 245 (2) IHA	1600	3200	3200	800
OHA	400	1600	200	200
OA	200	400	200	100
Se S 16 (7) IHA	3200	3200	3200	800
OHA	1600	800	200	400
OA	400	200	200	200
Se 180 (3) IHA	Ø	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	Ø	50	50
Se 270 (5) IHA	Ø	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	Ø	100	50

Tabelle 8c

Titerwerte in der indirekten Hämagglutination (IHA) der OH- und O-Bakterienagglutination (OHA und OA) zwischen den verfügbaren Seren und weiteren Antigenen des Typs 2 (in Klammern der O-Antigentyp nach der Komplementbindungsreaktion). Die homologen Reaktionen sind gesondert eingerahmt.

Seren:	Antigene: 239 (2)	Vibrio fetus Tübingen 1964 (2)	S 16 (7)
Se 266 (1)			
IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	100	400	100
OA	100	100	50
Se 264 (1)			
IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	Ø	Ø	Ø
OA	Ø	Ø	Ø
Se Pb 242 (1)			
IHA	Ø	Ø	50
OHA	50	50	50
OA	Ø	Ø	50
Se 233 (2)			
IHA	1600	800	1600
OHA	800	1600	800
OA	200	200	400
Se 245 (2)			
IHA	3200	400	1600
OHA	400	800	400
OA	200	200	50
Se S 16 (7)			
IHA	3200	400	6400
OHA	400	1600	1600
OA	400	400	200
Se 180 (3)			
IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	50	Ø	Ø
Se 270 (5)			
IHA	Ø	Ø	Ø
OHA	50	Ø	Ø

Tabelle 8d

Titerwerte in der indirekten Hämagglutination (IHA) und der OH-Bakterienagglutination (OHA) zwischen den verfügbaren Seren und den Antigenen der übrigen Stämme (Vibrio bubulus-Antigene, in Klammern der O-Antigentyp nach der Komplementbindungsreaktion). Die homologen Reaktionen sind gesondert eingerahmt.

Seren:		Antigene: 180 (3)	B785 (3)	S42 (4)	270 (5)	U15 (8)
Se 266	(1)					
IHA		Ø			Ø	
OHA		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Se 264	(1)					
IHA		Ø	Ø	Ø		Ø
OHA		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Se Pb 242	(1)					
IHA			Ø	Ø		Ø
OHA		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Se 233	(2)					
IHA			Ø	Ø	Ø	Ø
OHA		Ø	50	Ø	Ø	50
Se 245	(2)					
IHA		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
OHA		Ø	Ø	Ø	50	Ø
Se S 16	(7)					
IHA		Ø		Ø	Ø	
OHA		Ø	Ø	Ø	50	50
Se 180	(3)					
IHA		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
OHA		400	Ø	Ø	Ø	Ø
Se 270	(5)					
IHA		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
OHA		Ø	50	Ø	1600	100

homologen Reaktionen sind jeweils gesondert eingerahmt, das Zeichen "Ø" bedeutet negativen Reaktionsausfall auf der Serumverdünnungsstufe 1:50.

Die indirekte Hämagglutination ergab mit den Antigenen des Typs 1 (Tab. 8 a, S. 32) in den homologen Reaktionen mit den drei zugehörigen Seren Titerwerte zwischen 200 und 1 600. Mit den Seren des Typs 2 trat nur in einem Fall eine positive Reaktion auf der niedrigsten Titerstufe 50 ein und keine positive Reaktion mit den zwei Vibrio bubulus-Seren.

Mit den Antigenen des Typs 2 (Tab. 8 b und c, S. 33 und 34) ergaben sich in der indirekten Hämagglutination homologe Titerwerte zwischen 400 und 6 400, übergreifende Reaktionen ergaben sich mit den Seren des Typs 1 4mal auf der Titerstufe 50, mit den Vibrio bubulus-Seren keinmal.

Bei den fünf Vibrio bubulus-Stämmen ließ sich in keinem Fall ein in der indirekten Hämagglutination positiv reagierendes Antigen nachweisen, weder mit den zwei Vibrio bubulus-Seren noch in übergreifender Reaktion mit Vibrio fetus-Seren (Tab. 8 d, S. 35).

Von den Ergebnissen der indirekten Hämagglutination unterschieden sich die der beiden Bakterienagglutinationsverfahren in einigen Punkten. In der OH-Agglutination lagen die homologen Titerwerte im Typ 1 (Tab. 8 a) zwischen 100 und 3 200, im Typ 2 (Tab. 8 b und c) zwischen 200 und 1 600, sie waren insgesamt etwas niedriger als die entsprechenden Werte der indirekten Hämagglutination. Dagegen kamen übergreifende Reaktionen zwischen den beiden Vibrio fetus-Typen häufiger vor: 3mal von 9 Reaktionen

zwischen Stämmen des Typs 1 und Seren des Typs 2 (Tab. 8 a) und sogar 14mal von 21 Reaktionen zwischen Stämmen des Typs 2 und Seren des Typs 1. (Tab. 8 b und c).

In der OH-Agglutination der Vibrio bubulus-Stämme (Tab. 8 d) reagierten die zur Immunisierung benutzten Stämme 180 und 270 mit ihren Eigenseren auf der Titerstufe 400 bzw. 1 600, alle übrigen Werte lagen bei 100 oder darunter. Übergreifende Reaktionen ergaben sich mit Vibrio fetus-Seren 5mal, nur auf der Tierstufe 50. Der Stamm B 785 vom O-Antigentyp 3 reagierte nicht mit dem homologen Serum 180.

Die O-Agglutination zeigte zwischen Typ 1 und Typ 2 zwar etwas seltener übergreifende Reaktionen (mit 2 von 9 bzw. 10 von 21 Reaktionen, s. Tab.8 a, bzw. Tab. 8 b und c) als die OH-Agglutination, aber immer noch wesentlich mehr als die indirekte Hämagglutination. In den homologen Reaktionen blieben die Werte im Typ 1 (zwischen 200 und 400, s. Tab. 8 a) und ebenso im Typ 2 (zwischen 50 und 400, s. Tab. 8 b und c) weit hinter denen der anderen beiden Verfahren zurück.

Vibrio fetus Tübingen 1964, der einzige Stamm aus menschlichem Material, zeigte in der indirekten Hämagglutination die durchschnittlich niedrigsten Titerwerte des Typs 2 und wies in der OH-Agglutination die übergreifende Reaktion mit dem höchsten Titerwert 400 auf (mit dem Serum 266; Tab. 8 c, S. 34). Abgesehen von diesen quantitativen Antigenunterschieden, die ohne große Bedeutung sein dürften, ließen sich jedoch qualitative Antigenunterschiede gegenüber den tierischen Stämmen des Typs 2 nicht

nachweisen, auch nicht in einem Absättigungsversuch (Tab. 10, S. 40).

Eine wichtige Frage, die diese Versuche vor allem klären sollten, betraf den Vergleich der drei benutzten Verfahren in ihrem Wert für die Typendifferenzierung von Vibrio fetus-Stämmen. Die Differenzierung in die Typen 1 und 2 war bei allen drei Verfahren mit hohen homologen Reaktionen und niedrigen übergreifenden Reaktionen deutlich zu erkennen, jedoch mit unterschiedlicher Trennschärfe. Die Tabellen 9 a und 9 b (S. 39) aus den Werten der Tabellen 8 a-c ermittelt, sollen dies noch einmal deutlich machen.

Tabelle 9 a zeigt die Anzahl "falsch negativer", d. h. zu niedriger Titerwerte in den homologen Reaktionen, die unter den von uns angenommenen Mindesttiterwerten 200 bzw. 400 lagen. Tabelle 9 b zeigt die Anzahl "falsch positiver" übergreifender Reaktionen, deren Titerwerte 50 oder mehr bzw. 100 oder mehr betrugen. Für die indirekte Hämagglutination ergibt sich aus diesen Tabellen die einfache Regel, daß übergreifende Reaktionen immer unter 100, homologe Reaktionen immer über 100, meist über 200 lagen. Derart klare Verhältnisse waren bei der OH- und O-Agglutination nicht gegeben.

Die klare Unterscheidung in der indirekten Hämagglutination zwischen den beiden Vibrio fetus-Typen ließ sich in orientierenden Absättigungsversuchen noch weiter bestätigen. Je ein Serum der O-Antigentypen 1, 2 und 7 der Komplementbindungsreaktion wurde mit je einem Stamm dieser drei O-Antigentypen abgesättigt und dann diese insgesamt neun Serumpräparationen jeweils gegen den Eigenstamm in der

Tabelle 9 a

Vergleich der indirekten Hämagglutination (IHA), der OH- und O-Bakterienagglutination (OHA und OA) in Bezug auf die Differenzierung zwischen den Vibrio fetus-Typen 1 und 2: Anzahl der homologen Reaktionen, die einen bestimmten Titerwert (a: 200, b: 400) unterschreiten, im Verhältnis zur jeweiligen Gesamtzahl der Reaktionen (s. S. 38). Zusammengestellt aus den Ergebnissen der Tabellen 8 a-c.

	innerhalb Typ 1	innerhalb Typ 2	insgesamt
a: Titerwert unter 200			
IHA	0/9	0/21	0/30
OHA	1/9	0/21	1/30
OA	0/9	2/21	2/30
b: Titerwert unter 400			
IHA	2/9	0/21	2/30
OHA	1/9	3/21	4/30
OA	5/9	15/21	20/30

Tabelle 9 b

Vergleich der indirekten Hämagglutination (IHA), der OH- und O-Bakterienagglutination (OHA und OA) in Bezug auf die Differenzierung zwischen den Vibrio fetus-Typen 1 und 2: Anzahl der übergreifenden Reaktionen, die einen bestimmten Titerwert (a: 50, b: 100) erreichen oder überschreiten, im Verhältnis zur jeweiligen Gesamtzahl der Reaktionen (s. S. 38). Zusammengestellt aus den Ergebnissen der Tab. 8 a-c.

	zwischen Seren des Typs 2 und Antigenen des Typs 1	zwischen Seren des Typs 1 und Antigenen des Typs 2	insgesamt
a: Titerwert 50 oder mehr			
IHA	1/9	4/21	5/30
OHA	3/9	14/21	17/30
OA	2/9	10/21	12/30
b: Titerwert 100 oder mehr			
IHA	0/9	0/21	0/30
OHA	1/9	6/21	7/30
OA	1/9	3/21	4/30

Tabelle 10

Titerwerte von drei Vibrio fetus-Seren in der indirekten Hämagglutination gegen den Eigenstamm, nach Absättigung der Seren mit OH-Bakterien von drei verschiedenen Vibrio fetus-Stämmen.

	Seren nicht abgesättigt	Seren abgesättigt mit: 266 (1)	V.f.Tüb. 1964 (2)	S 16 (7)
a: Serum 264 (1) gegen Antigen 264	800	Ø	200	400
b: Serum 233 (2) gegen Antigen 233	3200	800	Ø	Ø
c: Serum S 16 (7) gegen Antigen S 16	6400	1600	Ø	Ø

indirekten Hämagglutination geprüft, zusätzlich wurde die Reaktion des unabgesättigten Serums als Kontrolle durchgeführt (Tab. 10). Nach Absättigung mit OH-Bakterien eines anderen Stammes desselben Hämagglutinationstyps verlief die indirekte Hämagglutination negativ. Zwischen den O-Antigentypen 2 und 7 der Komplementbindungsreaktion ergab sich dabei, wie schon erwähnt (S. 31), kein Unterschied. Dagegen erfolgte auf die Absättigung mit OH-Bakterien eines heterologen Stammes nur eine Senkung des Titerwertes des unabgesättigten Serums um ein bis zwei Titerstufen. Für weitergehende Antigenunterschiede innerhalb der beiden Hämagglutinationstypen boten diese orientierenden Versuche bei den verwendeten Stämmen keinen Anhaltspunkt.

C DISKUSSION

Die allgemeinen Eigenschaften des hier benutzten Hämagglutinationsantigens von Vibrio fetus zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den O-Antigenen der Enterobacteriaceae, an denen die wichtigsten systematischen Untersuchungen zur indirekten Hämagglutination durchgeführt worden sind. So ist dieses Antigen ebenfalls dem O-Antigen zuzurechnen: es ist erst nach Erhitzen nachzuweisen (S. 28) und zeigt keine Reaktion mit homologen H-Seren (S. 29). Es scheint jedoch zu einem geringen Anteil bereits in Kälte in Lösung gehen zu können, wenn auch in inaktiver Form: ein Überstand nicht erhitzter Bakterien zeigte auch noch ein positives Ergebnis, wenn er nachträglich erhitzt wurde (S. 28f). NETER et al. (1956a) beobachteten in Versuchen an Enterobacteriaceae ähnliche Erscheinungen. Sie postulierten daraus mindestens zwei verschiedene Vorgänge bei der Hitzeeinwirkung: einmal die Freisetzung des Antigens aus der Bakterienzelle, zum anderen die Umwandlung von bereits gelöstem, aber inaktiven Antigen in aktives Antigen, wobei nach Untersuchungen von SCHRAMM mit der Ultrazentrifuge die Verkleinerung der Teilchengröße eine Rolle spielen soll (s. NETER et al. 1956b). Nach den Untersuchungen von LANDY et al. (1955) am O-Antigen von S. typhosa werden durch die Hitze Lipide aus dem aus Lipopolysacchariden bestehenden Antigen abgespalten und dadurch die Adsorption des Antigens an die Erythrozyten erleichtert.

Das in den vorliegenden Untersuchungen benutzte Antigen aus Vibrio fetus dürfte ebenso wie die O-Antigene der Enterobacteriaceae vor allem aus

Lipopolysacchariden bestehen. WINTER (1965,1966) und DENNIS (1969) haben das in chemischen Analysen der von ihnen verwendeten Antigenpräparationen von Vibrio fetus-Stämmen bereits belegt.

Die schon biochemisch mögliche Unterscheidung von Vibrio fetus und Vibrio bubulus bereitet auch bei serologischen Untersuchungen keine Schwierigkeiten: es ergaben sich, wie auch bei anderen Untersuchern (s. S. 11), in der OH-Bakterienagglutination nur sehr wenige übergreifende Reaktionen. In der indirekten Hämagglutination bot sich sogar ein systematischer Unterschied: während diese Methode mit allen 10 Vibrio fetus-Stämmen gute Resultate mit hohen Titerwerten erbrachte, versagte sie bei allen 5 Vibrio bubulus-Stämmen. Welche Gründe diesem Versagen der Methode zugrunde lagen (z.B. schlechte Extrahierbarkeit der Antigene aus den Bakterien oder fehlende Adsorptionsfähigkeit an die Erythrozyten oder auch einfaches Fehlen entsprechender Antigene), war nicht zu klären. Ähnlich konnte BIBERSTEIN (1956a) mit seiner Methode zwar aus fast allen katalasepositiven, dagegen nur aus einem katalasenegativen Vibrionenstamm ein in der indirekten Hämagglutination reagierendes Antigen darstellen. Daß sich nur einige Bakterienarten für die indirekte Hämagglutination eignen, ist bekannt (s. die Übersicht von NETER 1956). Man ist versucht, bei der nahen Verwandtschaft von Vibrio fetus und Vibrio bubulus eine Beziehung zwischen der unterschiedlichen Eignung der beiden Arten für die indirekte Hämagglutination und ihrer unterschiedlichen Pathogenität zu suchen; immerhin haben einige Autoren in Tierversuchen den Endotoxincharakter der von ihnen aus Vibrio fetus-Stämmen dargestellten Hämaggluti-

nationsantigene nachgewiesen (DENNIS 1959, WINTER 1966). Jedoch gibt es genügend andere Bakterienarten, bei denen diese Beziehung nicht erfüllt ist.

Zur Typendifferenzierung der fünf Vibrio bubulus-Stämme war die indirekte Hämagglutination jedenfalls ungeeignet. Die OH-Bakterienagglutination mit Vibrio bubulus brachte nur in einer Reaktion ein anderes Ergebnis, als man auf Grund der vorgegebenen O-Antigentypen der Komplementbindungsreaktion erwartete: der Stamm B 785 vom O-Antigentyp 3 reagierte nicht mit dem homologen Serum 180.

Bei den Untersuchungen zur Typendifferenzierung der Vibrio fetus-Stämme wurde zunächst von dem vorgegebenen O-Antigentyp der Stämme in der Komplementbindungsreaktion ausgegangen. Der Stamm S 16 vom O-Antigentyp 7 war jedoch mit keiner der verwendeten Methoden von den Stämmen des O-Antigentyps 2 abzugrenzen (s. S. 31). Diese Abgrenzung des Typs 7 vom Typ 2 war in den Versuchen SOEDERLINDs (1961) mit der O-Bakterienagglutination ebenfalls nicht möglich, nach Angaben von MITSCHERLICH (s. WINKENwerder und MACIAK 1965) ist sie auch mit der Komplementbindungsreaktion bei einigen Stämmen nicht sicher durchführbar, die zahlenmäßige Bedeutung der Stämme des Typs 7 ist außerdem gering (KAMEL 1960: nur 4 von 67 bei Rindern isolierten Vibrio fetus-Stämmen). Als Ursache des serologischen Verhaltens des Stamms S 16 wäre auch eine Umwandlung des O-Antigens zu diskutieren, da MITSCHERLICH und HEIDER (1968) wenigstens für die Stämme des O-Antigentyps 1 eine Umwandlung in den O-Antigentyp 2 beschrieben haben. - Die Stämme der O-Antigentypen 2 und 7 wurden als Hämagglutinationstyp 2 zusammen-

gefaßt, während der Hämagglutinationstyp 1 dem O-Antigentyp 1 der Komplementbindungsreaktion entsprach.

Bei der Differenzierung zwischen den beiden Hämagglutinationstypen durch die Bakterienagglutination zeigte die OH-Agglutination mehrere übergreifende Reaktionen. Für sie dürfte vor allem das H-Antigen verantwortlich sein, welches nach Ansicht vieler Autoren (s. S. 13) bei den meisten Vibrio fetus-Stämmen gemeinsame Anteile hat. Demgemäß waren bei der O-Agglutination die übergreifenden Reaktionen seltener; allerdings waren die Titerwerte insgesamt wesentlich niedriger (auch in den homologen Reaktionen), sodaß die Zuordnung der Stämme zu den beiden Vibrio fetus-Typen mit der O-Agglutination nicht einfacher als mit der OH-Agglutination war. Auch in den Untersuchungen von WIIDIK und HLIDAR (1955) an Vibrio fetus finden sich bei der Verwendung von O-Antigen niedrigere Titerwerte gegenüber der OH-Agglutination, wie es auch bei vielen anderen Bakterienarten der Fall ist.

Durch seltenere und niedrigere übergreifende Reaktionen bei höheren homologen Titerwerten zeigte die indirekte Hämagglutination klarere Ergebnisse als die OH- und O-Agglutination. Alle 10 Vibrio fetus-Stämme ließen sich mit dieser Methode eindeutig einem der beiden Hämagglutinationstypen zuordnen. Eine innerhalb dieser Typen noch weiter aufgliedernde Differenzierung war mit dieser Methode in Absättigungsversuchen an einzelnen Stämmen und Seren nicht möglich (s. Tab. 10, S. 40).

Im Vergleich der Ergebnisse der indirekten Hämagglutination und der Komplementbindungsreaktion nach MITSCHERLICH ergab sich also bei den Vibrio fetus-Stämmen eine weitgehende Übereinstimmung. Wenn man von dem Stamm S 16 vom O-Antigentyp 7 absieht, entsprach die Zuordnung der übrigen neun Stämme zu den Hämagglutinationstypen den O-Antigentypen der Komplementbindungsreaktion. Auch für diese Methode hatte SOEDERLIND (1961) beobachtet, daß sie sich bei im Prinzip gleichartigem Reaktionsergebnis von der O-Bakterienagglutination durch die geringere Anzahl von übergreifenden Reaktionen unterscheidet. Offenbar werden durch den Extraktionsprozeß bei der Antigenherstellung für die Komplementbindungsreaktion bzw. für die indirekte Hämagglutination O-Antigenanteile ausgeschaltet, die allen Vibrio fetus-Stämmen gemeinsam sind. Zwischen den hier verwendeten Hitzeextrakten und den Phenolextrakten der Komplementbindungsreaktion dürften bei Vibrio fetus nach diesen Ergebnissen keine wesentlichen Antigenunterschiede bestehen, wie NETER et al. (1956a) bei den Enterobacteriaceae in vergleichenden Untersuchungen beider Methoden bereits gezeigt haben.

Bei dem Vergleich mit anderen Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination an Vibrio fetus (s. Einleitung S. 17 ff) ist besonders die Arbeit von BIBERSTEIN (1956a) wichtig, da nur sie sich ausführlich mit der Differenzierung einzelner Stämme unter Verwendung von Immunseren befaßt. Wie auf S. 17 ausgeführt, konnte BIBERSTEIN mit der indirekten Hämagglutination eine über die OH-Bakterienagglutination hinausgehende Typeneinteilung durchführen, wenn diese auch nur zwei Stämme von 44 Stämmen betraf. Ob diese Typeneinteilung zu den Hämagglutina-

tionstypen der vorliegenden Arbeit eine Beziehung hat, läßt sich nicht entscheiden. Für eine orientierende Untersuchung einer größeren Anzahl von Stämmen und Seren, wie er sie in der Serumverdünnung 1:10 durchführte, dürfte sich bei der hier verwendeten Methode die Serumverdünnung 1:100 oder 1:200 am meisten empfehlen, da sich so die größte Trennschärfe in die beiden Hämagglutinationstypen erreichen ließe.

Keinen Vergleichspunkt bieten die Untersuchungen von WINTER und DUNNE (1962), da sie hitzelabile Antigenpräparationen benutzten, die sich zudem nur an tannierten Erythrozyten anlagern ließen (S. 18f). Das in den späteren Untersuchungen von WINTER (1965, 1966) dargestellte Endotoxin dürfte mit seiner Lipopolysaccharidstruktur eher Behiehungen zum O-Antigen zeigen. Es wurde in der indirekten Hämagglutination nur gegen homologe Immunseren getestet, sodaß sich über die Möglichkeit unterschiedlicher Typen nichts aussagen läßt. Auch aus den Untersuchungen von TE PUNGA (1958, 1961) und DENNIS (1959) lassen sich Hinweise auf unterschiedliche Typen der von ihnen dargestellten Hämagglutinationsantigene nicht entnehmen (S. 19), während NEWSAM et al. (1967) nur Antigene aus Vibrio fetus Typ venerealis verwendeten.(S. 20).

Dagegen könnten die von RISTIG und BRANDLY (1959) angegebenen zwei "HS"-Antigentypen bei animalen Vibrio fetus-Stämmen (s. S. 17f) den Hämagglutinationstypen durchaus entsprechen, wenn auch ein direkter Vergleich nicht möglich war. Daß jedoch das "HS"-Antigen humaner Stämme von denen der tierischen Stämme deutlich unterschieden war, findet in dem Verhalten

des humanen Stammes Vibrio fetus Tübingen 1964 keine Parallele, da dieser keine wesentlichen Antigendifferenzen gegenüber den animalen Stämmen desselben Hämagglutinationstyps bot (s. S. 37).

Den Untersuchungen der anderen Autoren mit der indirekten Hämagglutination läßt sich kein sicherer Hinweis darauf entnehmen, ob sich mit dieser Methode eine pathogenetisch relevante Differenzierung von Vibrio fetus-Stämmen durchführen läßt. Als Bezugspunkt für eine solche Differenzierung bietet sich vor allem die Klassifikation von FLORENT (1959) in die Typen venerealis und intestinalis an, deren unterschiedliche Tierpathogenität vielfach belegt worden ist (s. S. 5f). Wenn man nach MITSCHERLICH (1961) davon ausgehen darf, daß die O-Antigentypen 1 und 2 der Komplementbindungsreaktion den Typen venerealis und intestinalis entsprechen (s. S. 15), war mit der indirekten Hämagglutination die Zuordnung der verwandten Vibrio fetus-Stämme zu diesen Typen von FLORENT eindeutig möglich.

Zusammengefaßt stellt die indirekte Hämagglutination also eine der Bakterienagglutination überlegene Methode dar, mit der sich Vibrio fetus- und Vibrio bubulus-Stämme klar trennen und vor allem die Vibrio fetus-Stämme sich in tierpathogenetisch unterschiedliche Typen aufgliedern lassen, während eine Differenzierung von Vibrio bubulus-Stämmen mit ihr nicht möglich war. Auch für die Humanmedizin dürfte dies von Bedeutung sein, da nur bei der systematischen Durchführung einer über die Artdiagnose hinausgehenden Typendifferenzierung der humanen Vibrio fetus-Stämme weitere Einsichten in die Epidemiologie der humanen Vibriosen möglich sein werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 10 Vibrio fetus- und 5 Vibrio bubulus-Stämme, deren O-Antigentyp in der Komplementbindungsreaktion nach MITSCHERLICH bereits bekannt war, mit 8 Kaninchenimmunseren (OH-Seren, 6 von Vibrio fetus- und 2 von Vibrio bubulus-Stämmen) serologisch untersucht. Als Methoden dienten die OH- und O-Bakterienagglutination und die indirekte Hämagglutination (O-Antigenanlagerung nach NETER) sowie Absättigungsversuche.

Aus allen Vibrio fetus-Stämmen ließ sich ein in der indirekten Hämagglutination reagierendes Antigen nachweisen, die allgemeinen Eigenschaften dieser Antigene werden näher charakterisiert. Dagegen versagte diese Methode bei den zur Verfügung stehenden 5 Vibrio bubulus-Stämmen.

Die Differenzierung zwischen Vibrio fetus und Vibrio bubulus war in der indirekten Hämagglutination wegen ihrer unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit also sehr einfach. Auch in der OH-Bakterienagglutination ergaben sich zwischen diesen Arten nur sehr wenige übergreifende Reaktionen.

Die Differenzierung der Vibrio fetus-Stämme in die O-Antigentypen 1 und 2 nach MITSCHERLICH (entsprechend den Typen venerealis und intestinalis nach FLORENT) war mit der indirekten Hämagglutination eindeutig möglich. Diese Methode zeigte mit geringeren Titerwerten in den übergreifenden Reaktionen zwischen den beiden Typen und höheren Titerwerten inden homologen Reaktionen innerhalb der Typen klarere Ergebnisse als die Bakterienagglutinationen.

Ein Vibrio fetus-Stamm vom O-Antigentyp 7 ließ sich nicht von den Stämmen des O-Antigentyps 2 unterscheiden. Die O-Antigentypen 2 und 7 wurden deshalb in einen Hämagglutinationstyp 2 zusammengefaßt, während der Hämagglutinationstyp 1 dem O-Antigentyp 1 der Komplementbindungsreaktion entsprach.

Orientierende Absättigungsversuche mit einzelnen Stämmen und Seren bestätigten die Ergebnisse der anderen Methoden, ohne einen Anhalt für weitergehende Antigenunterschiede innerhalb der Hämagglutinationstypen zu bieten.

LITERATURVERZEICHNIS

AKKERMANS, J.P.W.M., TERPSTRA, J.I. en van WAVEREN, H.G.: Over de betekenis van verschillende Vibrionen voor de sterelitet van het rund. T. Diergeneesk. 81, 430 (1956). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 26, 421 (1956).

Anonym: The pathogenicity of Vibrio fetus. Vet. Rec. 70, 393 (1958).

BADER, R.-E.: Die Latex-Geißel-Agglutination. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 150, 199 (1964).

BADER, R.-E., WINKLER H. und MARGET, W.: Vibrio fetus als Erreger einer Säuglingsmeningitis. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 199, 202 (1966).

BELDEN, E.L. and ROBERTSTAD, G.W.: Application of fluorescent antibody technique for serotyping Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 26, 1437 (1965).

BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. and SMITH, N.R. 7th ed. Baltimore 1957.

(a) BIBERSTEIN, E.L.: Serological variants among strains of Vibrio fetus. Cornell Vet. 46, 144 (1956).

(b) BIBERSTEIN, E.L.: Growth and bacterial morphology as related to antigen sensitivity of Vibrio fetus cultures. Cornell Vet. 46, 169 (1956).

BOKKENHEUSER, V.: Vibrio fetus infection in man. J. Amer. vet. med. Ass. 152, 1330 (1968).

BOND, J.M.: Characteristics of colonial forms of Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 18, 449 (1957).

BRYNER, J.H. and FRANK, A.H.: A preliminary report on the identification of Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 16, 76 (1955).

BRYNER, J.H., FRANK, A.H. and O'BERRY, P.A.: Dissociation studies of Vibrios from the bovine genital tract. Amer. J. vet. Res. 23, 32 (1962).

BRYNER, J.H., O'BERRY, P.A. and FRANK, A.H.: Vibrio infection of the digestive organs of cattle. Amer. J. vet. Res. 25, 1048 (1964).

BURGERT, W. and HAGSTROM, J.W.C.: Vibrio fetus meningoencephalitis. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) 10, 196 (1964).

CURTISS, A.H.: A motile curved anaerobic bacillus in uterine discharges. J. infect. Dis. 12, 165 (1913).

DARRELL, J.H., FARRELL, B.C. and MULLIGAN, R.A.: Case of human vibriosis. Brit. med. J. 1967 II, 287.

DENNIS, S.M.: Isolation of a lipopolysaccharide from Vibrio fetus. Nature (Lond.) 183, 186 (1959).

DENNIS, S.M.: The effect of bacterial endotoxin on pregnancy. Vet. Bull. (Weybridge) 36, 123 (1966).

DILIELLO, L.R., POELMA, L.J. and FABER, J.E.: Biochemical and morphological separation of some members of the genus Vibrio. Amer. J. vet. Res. 20, 532 (1959).

DOYLE, L.P.: A vibrio associated with swine dysentery. Amer. J. vet. Res. 5, 3 (1944).

DOZSA, L., MITCHELL, R.G. and OLSON, N.C.: Histologic changes of the uterine mucosa following the duration of Vibrio infection and the subsequent development of immunity. Amer. J. vet. Res. 23, 769 (1962).

EDEN, A.N.: Vibrio fetus meningitis in a newborn infant. J. Pediat. 61, 33 (1962).

FIREHAMMER, B.D. and BERG, R.L.: The use of temperature tolerance in the identification of Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 26, 995 (1965).

FLORENT, A.: Isolement d'un vibrion saprophyte du sperme du taureau et du vagin de la vache. C.R. Soc. Biol. (Paris) 147, 2066 (1953).

FLORENT, A.: Über die Diagnostik der Genitalvibriose des Rindes. Zuchthyg. Fortpfl. Stör. Besam. Haustiere 3, 30 (1959).

FLORENT, A. and de KEYSER, P.: Problems of infertility in livestock in Belgium . Brit. vet. J. 120, 407 (1964).

GALLUT, J.: Recherches immunochimiques sur Vibrio foetus. I. Étude sérologique préliminaire de 10 souches d'origines diverses. II. Fractionnement chimique des corps microbiens et étude sérologique de deux fractions antigéniques. Ann. Inst. Past. 83, 449 und 455 (1952).

GALLUT, J., CHEVÉ, J. et GAUTHIER, J.: Étude immunochimique de 20 vibrions provenant d'avortements bovins. Comparaison avec 2 souches de Vibrio foetus. Ann. Inst. Past. 93, 683 (1957).

HOOD, M. and TODD, J.M.: Vibrio fetus - a cause of human abortion. Amer. J. Obstet. Gynec. 80, 506 (1960).

HUBRIG, T. und WOHANKA, K.: Serologische und biochemische Untersuchungen an Vibrionen. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 69, 4 (1956).

JONES, F.S., ORCUTT, M. and LITTLE, R.B.: Vibrios (Vibrio jejuni, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. J. exp. Med. 53, 853 (1931).

KAMEL, M.M.: Isolierung und Differenzierung der beim Rinde vorkommenden Vibrionen. Inaug. Diss. Hannover 1960.

KEOGH, E.V., NORTH, E.A. and WARBURTON, M.F.: Haemagglutinins of the Haemophilus group. Nature (Lond.) 160, 63 (1947).

KEOGH, E.V., NORTH, E.A. and WARBURTON, M.F.: Adsorption of bacterial polysaccharides to erythrozytes. Nature (Lond.) 161, 687 (1948).

KIENINGER, G.: Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination. Inaug. Diss. Tübingen 1964.

KILO, C., HAGEMANN, P.O. and MARZI, J.: Septic arthritis and bacteremia due to Vibrio fetus. Amer. J. Med. 38, 962 (1965).

KING, E.O.: Human infection with Vibrio fetus and a closely related vibrio. J. infect. Dis. 101, 119 (1957).

KING, E.O.: The laboratory recognition of Vibrio fetus and a closely related vibrio isolated from cases of human vibriosis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 98, 700 (1962).

KUZDAS, C.D. and MORSE, E.V.: Physiological characteristics differentiating Vibrio fetus and other vibrios. Amer. J. vet. Res. 17, 331 (1956).

LAING, J.A. (Ed.): Vibrio fetus infection of cattle. FAO Agricultural studies Nr. 51. Revised edition. Rom 1960.

LANDY, M., TRAPANI, R.J. and CLARK, W.R.: Studies on the O-antigen of Salmonella typhosa. Amer. J. Hyg. 62, 54 (1955).

LECCE, J.G.: Some biochemical characteristics of Vibrio fetus and other related vibrios isolated from animals. J. Bact. 76, 312 (1958).

de LEY, J.: Pseudomonas and related genera. Ann. Rev. Microbiol. 18, 17 (1964).

LOESCHE, W.J., GIBBONS, R.J. and SOCRANSKY, S.S.: Biochemical characteristics of Vibrio sputorum and relationship to Vibrio bubulus and Vibrio fetus. J. Bact. 89, 1109 (1965).

MACIAK, T. und WINKENWERDER, W.: Kulturelle, tierexperimentelle und vergleichende serologische Untersuchungen an Schweinevibrionen. Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 11, 693 (1964).

MANDEL, A.D. and ELLISON, R.C.: Acute dysentery syndrome caused by Vibrio fetus - report of a case. J. Amer. med. Ass. 185, 536 (1963).

MARSH, H. and FIREHAMMER, B.D.: Serological relationship of 23 ovine and 3 bovine strains of Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 14, 396 (1953).

MILLER, V.A., JENSEN, R. and OGG, J.E.: Immunisation of sheep against ovine vibriosis with bacterins containing serotype I and serotype V in mineral oil. Amer. J. vet. Res. 25, 664 (1964).

MITSCHERLICH, E.: Die Differenzierung der beim Rinde vorkommenden Vibrionen und ihre pathogene Bedeutung. IV. int. Kongr. Fortpfl. d. Tiere (den Haag) 551 (1961).

MITSCHERLICH, E. und HEIDER, R.: Formenwechsel der O-Antigene bei Vibrio fetus. Zbl. Vet.- Med. Reihe B, 15, 486 (1968).

MITSCHERLICH, E. und LIESS, B.: Die pathogene Bedeutung der bei Rind und Schaf isolierten Vibrionen. Mh. Tierheilk. 10, 351 (1958).

MOHANTY, S.B., PLUMER, G.J. and FAVOR, J.E.: Biochemical and colonial characteristics of some bovine vibrios. Amer. J. vet. Res. 23, 554 (1962).

MOORE, B.: Observations on a group of anaerobic vaginal vibrios. J. Path. Bact. 67, 461 (1954).

MORGAN, J.B.: Studies on the antigenic structure of Vibrio fetus. J. comp. Path. 69, 125 (1959).

NETER, E.: Bacterial hemagglutination and hemolysis. Bact. Rev. 20, 166 (1956).

NETER, E., BERTRAM, L.E., ZAK, D.A., MURDOCK, M.R. and ARBESMAN, C.E.: Studies on hemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera. J. exp. Med. 96, 1 (1952).

(a) NETER, E., WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. and GORZYNSKI, E.A.: The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to Enterobacteriaceae. Ann. N.Y. Acad. Sci. 66, 141 (1956).

(b) NETER, E., WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., GORZYNSKI, E.A. and EICHENBERGER, E.: Studies on enterobacterial lipopolysaccharides. Effects of heat and chemicals on erythrozyte modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties. J. Immunol. 76, 377 (1956).

NEWSAM, I.D.B., CLARK, B.L. and St. GEORGE, T.D.: Diagnosis of bovine vibriosis. Part 2: Indirect haemagglutination using tanned sheep erythrocytes. Aust. vet. J. 43, 278 (1967). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 38, 198 (1968).

NEWSAM, I.D.B. and St. GEORGE, T.D.: Diagnosis of bovine vibriosis. Part 3: Indirect haemagglutination using untanned sheep erythrocytes. Aust. vet. J. 43, 283 (1967). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 38, 198 (1968).

OGG, J.E.: Studies on the coccoid forms of Vibrio fetus. I. Cultural and serologic investigations. Amer. J. vet. Res. 23, 354 (1962).

PARK, R.W.A., MUNRO, J.B., MELROSE, D.R. and STEWART, D.L.: Observations on the ability of two biochemical types of Vibrio fetus to proliferate in the genital tract of cattle and their importance with respect to infertility. Brit. vet. J. 118, 411 (1962).

PECKHAM, M.C.: Avian vibrionic hepatitis. Avian Dis. 2, 348 (1958).

PILCHARD, E.I. and RISTIC, M.: A report of the use of a gel diffusion test for the diagnosis of Vibrio fetus infection of cattle. Proc. 66th. ann. meet. US livestock sanit. Ass. (Washington) 1962, 449. Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 33, 614 (1963).

PLASTRIDGE, W.N., WILLIAMS, L.F. and PETRIE, D.: Vibrionic abortion in cattle. Amer. J. vet. Res. 8, 178 (1947).

PLASTRIDGE, W.N., WILLIAMS, L.F. and TROWBRIDGE, B.A.: Antibiotic sensitivity of physiologic groups of microaerophilic vibrios. Amer. J. vet. Res. 25, 1295 (1964).

PRÉVOT, A.R.: Études de systématique bactérienne. V. Essai de classification des Vibrions anaérobies. Ann. Inst. Past. 64, 117 (1940).

PRICE, K.E., POELMA, L.J. and FABER, J.E.: Serologic and physiologic relationships between strains of Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 16, 164 (1955).

REICH, C.V., HEIST, C.E. and DUNNE, H.W.: Agglutinin-adsorption analysis of Vibrio fetus. J. Bact. 82, 210 (1961).

RINGEN, L. and FRANK, F.W.: Differentiation of Vibrio fetus and Vibrio bubulus based upon reactions in media containing ferrous sulfate. J. Bact. 86, 344 (1963).

RISTIC, M.: The characteristics of agglutination antigen of Vibrio fetus. Amer. J. vet. Res. 18, 764 (1957).

RISTIC, M. and BRANDLY, C.A.: Characterization of Vibrio fetus antigens. I. Chemical properties and serological activities of a soluble antigen. II. Agglutination of polysaccharide - sensitized sheep erythrocytes by spezific antiserums. Amer. J. vet. Res. 20, 148 und 154 (1959).

RISTIC, M. and MURTY, D.K.: Characterization of Vibrio fetus antigens. IV. Study of polysaccharide - antibody - reactions by a rapid gel diffusion technique. Amer. J. vet. Res. 22, 783 (1961).

RISTIC, M. and WALKER, J.: Characterization of Vibrio fetus antigens. III. Study of serological and biophysical properties of a polysaccharide fraction in a hemolytic system. Amer. J. vet. Res. 21, 884 (1960).

ROLLE, M.: Vergleichende Untersuchungen der Eigenschaften von Genital- und Darmvibrionen des Rindes. Festschr. Wien. tierärztl. Mschr. 1964, 61.

SCHARF, W.: Serologische Untersuchungen über Vibrionen. Inaug. Diss. München 1958.

SEBALD, M. et VÉRON, M.: Teneur en bases de l'ADN et classification de vibrions. Ann. Inst. Past. 105, 897 (1963).

SMITH, T.: Spirilla assoziated with disease of the fetal membranes in cattle (infectious abortion). J. exp Med. 28, 701 (1918).

SMITH, T. and TAYLOR, M.S.: Some morphological and biological characters of the spirilla (Vibrio fetus n. sp.) assoziated with disease of the fetal membranes in cattle. J. exp. Med. 30, 299 (1919).

SOEDERLIND, O.: Serologische Differenzierung von Vibrio fetus-Stämmen. Mh. Tierheilk. 13, 42 (1961).

SPECK, J.: Die serologische Differenzierung von Hühnervibrionen mittels der Komplementbindungsreaktion. Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 12, 541 (1965).

SPINK, W.W.: Human vibriosis caused by Vibrio fetus. J. Amer. med. Ass. 163, 180 (1957).

TE PUNGA, W.A.: An indirect haemagglutination test for the detection of Vibrio fetus antibodies. I. Development and properties of antigen. N.Z. vet. J. 6, 157 (1958). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 29, 422 (1959).
II. Detection of Vibrio fetus antibody in bovine vaginal mucus. N.Z. vet. J. 6, 161 (1958). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 29, 422 (1959).
III. Preservation of sensitized erythrocytes. N.Z. vet. J. 7, 72 (1959). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 30, 115 (1960).

TE PUNGA, W.A. and MOYLE, G.C.: An indirect haemagglutination test for the detection of Vibrio fetus antibodies. IV. Nonspezific reactivity of bovine serum. N.Z. vet. J. 9, 41 (1961). Referat in Vet. Bull. (Weybridge) 31, 634 (1961).

VAHLENKAMP, F.: Ein Beitrag zur Sanierung Vibrio fetus-infizierter Deckringe unter Beibehaltung des natürlichen Deckaktes. Tierärztl. Umsch. 20, 213 (1965).

VALLÉE, A., le CAIN, A., THIBAULT, P. et SECOND, L.: Isolement chez la chatte d'un vibrion voisin de Vibrio foetus. Bull. Acad. vét. Fr. 34, 151 (1961).

VINCENT, R., DUMAS, J. et PICARD, N.: Septicémie grave au cours de la grossesse, due a un vibrion. Avortement consécutif. Bull. Acad. nat. Méd. (Paris) 131, 90 (1947).

WHEELER, W.E. and BORCHERS, J.: Vibrionic enteritis in infants. A.M.A. J. Dis. Child. 101, 60 (1961).

WHITE, W.D.: Human vibriosis: indigenous cases in England. Brit. med. J. 1967 II, 283.

WIIDIK, R.W. und HLIDAR, G.F.: Untersuchungen über die Antigenstruktur von Vibrio fetus vom Rind: Das Kapsel- oder K-Antigen. Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 2, 238 (1955).

WINKENWERDER, W.: Die Beurteilung der Pathogenität von Vibrionen aus den Geschlechtswegen des Rindes. Tierärztl. Umsch. 20, 211 (1965).

WINKENWERDER, W.: Untersuchungen an von Menschen isolierten Stämmen des Vibrio fetus. Z. med. Mikrobiol. 152, 273 (1966).

WINKENWERDER, W.: Infektionsversuche an Schafen mit Vibrio fetus-Stämmen humaner und aviärer Herkunft. Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 14, 737 (1967).

WINKENWERDER, W. und BÖTTCHER, R.: Vibrionen bei Pferden. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 78, 361 (1965).

WINKENWERDER, W. und MACIAK, T.: Vibrionenbefunde bei Hühnern aus erkrankten Beständen und bei Schlachthühnern. Dtsch. tierärztl. Wschr. 71, 625 (1964).

WINKENWERDER, W. und MACIAK, T.: Das Vorkommen von Vibrionen bei Rindern in Nordwestdeutschland. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 78, 161 (1965).

WINKENWERDER, W. und MITSCHERLICH, E.: Die einheitliche Benennung der O-Antigene der von Haustieren isolierten Vibrionen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 199, 213 (1966).

WINTER, A.J.: An antigenic analysis of Vibrio fetus. II. Further characterization of the precipitating antigen. Amer. J. vet. Res. 24, 193 (1963).

WINTER, A.J.: Characterization of the antibody for Vibrio fetus endotoxin in sera of normal and Vibrio fetus infected cattle. J. Immunol. 95, 1002 (1965).

WINTER, A.J.: An antigenic analysis of Vibrio fetus. III. Chemical, biological and antigenic properties of the endotoxin. Amer. J. vet. Res. 27, 653 (1966).

WINTER, A.J. and DUNNE, H.W.: An antigenic analysis of Vibrio fetus. I. Properties of soluble extracts of the organism. Amer. J. vet. Res. 23, 150 (1962).

Herrn Professor Dr. R.-E. Bader möchte ich für die Überlassung des Themas und die sorgfältige Anleitung bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit herzlich danken.

Außerdem möchte ich noch Herrn Professor Dr. Dr. h.c. K. Wagener (Hannover) und Herrn Professor Dr. E. Mitscherlich (Göttingen) für die Überlassung der Vibrionenstämme und der Ergebnisse ihrer Untersuchungen mit der Komplementbindungsreaktion meinen besonderen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 18. August 1941, wurde ich, Christoph Bayer, als Sohn des Pastors Wilhelm Bayer und seiner Ehefrau Anni, geb. Kruska, in Schleswig geboren. In Kropp bei Schleswig bin ich aufgewachsen und habe die dortige Volksschule und danach die Domschule Schleswig bis zum Abitur 1961 besucht. Anschließend habe ich an den Universitäten Kiel, Göttingen und Tübingen Medizin studiert und im Januar 1967 in Tübingen das medizinische Staatsexamen abgelegt.